

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

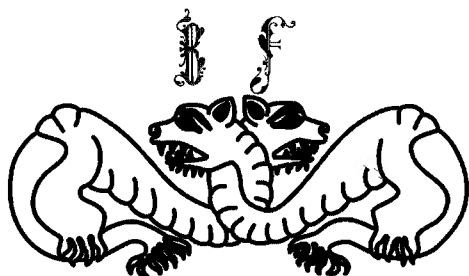
МЕТОДЫ
ЭКСПЕРИМЕН-
ТАЛЬНОЙ
МИКО-
ЛОГИИ

СПРАВОЧНИК

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
ИМ. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МИКОЛОГИИ

СПРАВОЧНИК



КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1982

Справочник является наиболее полным в отечественной литературе пособием по современным методам экспериментальной микологии. В нем описаны методы изучения морфологии, физиологии, генетики патогенных и непатогенных грибов и грибов, вызывающих повреждение материалов, изделий и сооружений, методы их культивирования, выделения физиологически активных веществ (ферментов, токсинов, антибиотиков, фитотоксинов), а также изучения грибов в экстремальных условиях роста — под воздействием различных видов радиации, температуры и других факторов.

Для специалистов в области теоретической и прикладной микологии, фитопатологии, медицины, ветеринарии, пищевой промышленности, защиты сырья, материалов, изделий и сооружений, а также для аспирантов и студентов соответствующих специальностей.

Авторы

И. А. ДУДКА, С. П. ВАССЕР, И. А. ЭЛЛАНСКАЯ, Э. З. КОВАЛЬ,
Л. Т. ГОРБИК, Е. А. НИКОЛЬСКАЯ, В. И. БИЛАЙ, Т. И. БИЛАЙ,
В. Н. БОРИСОВА, В. С. СИВЕРС, Е. Г. МУСИЧ, Ю. В. ЛИЗАК,
А. Я. СТРИЖЕВСКАЯ, В. Л. АЙЗЕНБЕРГ, Л. М. КИРИЛЛОВА,
С. И. БЕЗБОРОДОВА, А. М. ЗАЙЧЕНКО, Л. А. ЗАКОРДОНЕЦ,
Т. Я. МЕТЕЙКО, Д. Н. ЧЕРМЕНСКИЙ, С. М. ЩЕРБИНА, С. Н. ХАРЧЕНКО,
З. А. КУРБАЦКАЯ, А. М. БЕЗБОРОДОВ, Л. А. БОГОМОЛОВА,
О. А. БЕРЕСТЕЦКИЙ, В. Ф. ПАТЫКА, М. М. ЛЕВИТИН, Л. А. МИ-
ХАЙЛОВА, И. Г. ОДИНЦОВА, О. С. АФАНАСЕНКО, Н. Н. ЖДАНОВА,
А. И. ВАСИЛЕВСКАЯ, П. Н. КАШКИН, Т. С. КИРИЛЕНКО,
А. С. БУХАЛО, Т. И. РЕДЧИЦ

Ответственный редактор *В. И. Билай*

Рецензенты

Д. М. Гродзинский, М. С. Матышевская, М. Н. Ротмистров

Редакция справочной литературы

М $\frac{2003000000-009}{M221(04)-82}$ 577-81

© Издательство «Наукова думка», 1982

ПРЕДИСЛОВИЕ

Начало развития экспериментальной микологии относится к концу XIX в. Ему предшествовал длительный и примечательный выдающимися открытиями период изучения цитологии, экологии грибов, их онтогенеза и циклов развития, период создания основ научной фитопатологии. В результате микология из описательной науки, занимающейся изучением морфологии и систематики, превратилась в экспериментальную, изучающую роль грибов в природе и практической деятельности человека.

Современная микология включает ряд самостоятельных научных направлений: систематику, экологию, физиологию, генетику грибов и другие, а также отдельные их отрасли: общую, сельскохозяйственную, медицинскую, техническую, водную микологию и др. Современная экспериментальная микология характеризуется сочетанием классических и новых методов исследования организмов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Огромнейшие возможности изучения и регуляции процессов жизнедеятельности грибов открывает созданная в последнее десятилетие и все более совершенствующаяся техника культивирования микроорганизмов, базирующаяся на современных биохимических и физико-химических методах исследования грибов. Достигнуты значительные успехи в решении многих сложнейших проблем микологии: биосинтезе многообразных физиологически активных веществ, промышленном использовании грибов, защите окружающей среды. Культивирование облигатных паразитов фитопатогенных грибов (ржавчинных, головневых, мучнисторосяных и др.), в частности, позволило выяснить тонкие механизмы заболеваний и защитных реакций растения-хозяина. Изучение биосинтетической способности грибов привело к выделению сложных по химической природе и специфических по биологическим свойствам метаболитов. Известно, например, что пенициллины — первые антибиотики, выделенные из грибов, представляли новый класс химических соединений. Изучение специфических реакций превращения стероидов отдельными видами грибов послужило основой промышленного получения новых производных стероидов в качестве лекарственных препаратов. Широкое применение в народном хозяйстве нашли различные ферменты грибов, активные по отношению к большинству известных субстратов.

Одним из основных вопросов в области изучения биологически активных метаболитов грибов является установление условий их максимального биосинтеза, разработка методов получения их препара-

тов с целью всестороннего изучения свойств. Так, в лабораториях многих стран мира проводятся исследования по микотоксинам (приоритет их выделения и изучения патологического влияния на организм человека, животных и растений принадлежит советским ученым). Почти все известные микотоксины являются комплексом компонентов, близких по химической природе, но обладающих различной биологической активностью. Токсины многих видов грибов, как и антибиотики, применяют в биохимических исследованиях в качестве более или менее специфических ингибиторов отдельных биохимических процессов.

Большинство видов микроскопических грибов в значительно меньшей степени, чем бактерии, требовательны к наличию в среде сложных органических веществ — белков, аминокислот, витаминов. Несомненно перспективно изучение возможности использования грибов для превращения трудно усваиваемых субстратов, биосинтеза биологически активных веществ в экстремальных условиях.

До последнего времени уделялось чрезвычайно мало внимания изучению физиологических свойств и морфогенеза грибов, условий вегетативного роста и образования репродуктивных органов в связи с их биосинтетической активностью. Тем не менее идентификация специфических метаболитов (гормонов), обуславливающих дифференциацию мицелия в связи с образованием репродуктивных органов, играет весьма важную роль в регулировании жизнедеятельности грибов. При изучении этих и многих других вопросов исследователь неизменно сталкивается с методами выделения грибов из определенных субстратов, их культивирования, определения роста и биосинтетической активности. В отечественной литературе почти нет справочных изданий по современным методам экспериментальной микологии. Руководство «Методика микологических и фитопатологических исследований» Н. А. Наумова (1937 г.) является библиографической редкостью. Авторы данного справочника сделали попытку восполнить этот пробел.

Чл.-кор. АН УССР В. И. БИЛАЙ

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 3

Принятые сокращения 23

I. Изучение элементов морфологии грибов 25

 I.1. Общие сведения (И. А. Дудка) 25

 I.2. Низшие грибы 25

 I.2.1. Класс Chytridiomycetes 25

 I.2.1.1. Элементы морфологии таллома 25

 I.2.1.2. Бесполое размножение 28

 I.2.1.3. Половое размножение 29

 I.2.1.4. Чередование циклов полового и бесполого размножения 29

 I.2.2. Класс Hyphochytriomycetes 30

 I.2.2.1. Элементы морфологии таллома 30

 I.2.2.2. Бесполое размножение 30

 I.2.2.3. Половое размножение 30

 I.2.3. Класс Oomycetes 30

 I.2.3.1. Элементы морфологии таллома, бесполое и половое размножение 30

 I.2.4. Класс Zygomycetes 36

 I.2.4.1. Элементы морфологии таллома 36

 I.2.4.2. Бесполое размножение 37

 I.2.4.3. Половое размножение 38

 I.2.5. Класс Trichomycetes 39

 I.2.5.1. Элементы морфологии таллома 39

 I.2.5.2. Бесполое размножение 39

 I.2.5.3. Половое размножение 39

 I.3. Высшие грибы 40

 I.3.1. Класс Ascomycetes 40

 I.3.1.1. Элементы морфологии плодовых тел 40

 I.3.1.2. Половое размножение 41

 I.3.1.3. Бесполое размножение 42

 I.3.2. Класс Basidiomycetes (С. П. Вассер) 42

 I.3.2.1. Плодовые тела (карпофоры, спорофоры, базидиофоры) 43

 I.3.2.2. Морфология примордиев и развитие плодовых тел 43

 I.3.2.3. Морфология шляпки 45

 I.3.2.4. Морфология покровов 45

 I.3.2.5. Морфология мякоти шляпок 45

I.3.2.6. Морфология и структура гиф	47
I.3.2.7. Морфология и структура гименофора	49
I.3.2.8. Микроскопирование гимениального слоя	51
I.3.2.9. Базидии	51
I.3.2.10. Базидиоспоры и другие спороношения	54
I.3.2.11. Цистиды	56
I.3.2.12. Ножка	56
I.3.2.13. Макро- и микроскопические химические цветové реакции	59
I.3.3. Класс Deuteromycetes (И. А. Элланская)	59
I.3.3.1. Общие сведения	59
I.3.3.2. Органы размножения	61
I.3.3.3. Конидии	68
I.3.3.4. Онтогенез конидий	71
I.3.3.5. Пигментация конидий и конидиеносцев	73
I.3.3.6. Мицелий	74
I.3.3.7. Колония	75
 II. Микроскопическое изучение грибов (Э. З. Коваль, Л. Т. Горбик)	76
II.1. Световая микроскопия	76
II.1.1. Общие сведения	76
II.1.2. Основные правила работы с микроскопом	76
II.1.2.1. Микроскопирование с сухими и иммерсионными системами	77
II.1.2.2. Микроскопия в темном поле	77
II.1.2.3. Рисовальный аппарат	78
II.1.2.4. Измерение объектов при микроскопии	78
II.1.3. Подготовка материала для исследований в световом микро- скопе	80
II.1.3.1. Подсчет конидий	80
II.1.4. Изучение объектов в живом состоянии и приготовление временных препаратов	81
II.1.4.1. Метод раздавленной капли	81
II.1.5. Изучение фиксированных препаратов	83
II.1.5.1. Методы фиксации	83
II.1.5.2. Основные красители	83
II.1.5.3. Дифференциальное окрашивание содержимого гиф гри- бов	84
II.1.5.4. Специальные методы окрашивания	84
II.2. Люминесцентная микроскопия	92
II.2.1. Общие сведения	92
II.2.2. Подготовка препаратов	92
II.2.2.1. Флюорохромирование живых препаратов	92
II.2.2.2. Флюорохромирование фиксированных препаратов	92
II.2.2.3. Прямое флюорохромирование клеточных структур	95
II.2.2.4. Определение количества мертвых клеток	96
II.3. Электронная микроскопия	97
II.3.1. Общие сведения	97
II.3.2. Подготовка препаратов	97
II.3.2.1. Размещение пленок-подложек на сетках	99
II.3.2.2. Приготовление суспензий, содержащих объект исследова- ния	99
II.3.2.3. Высушивание препаратов	103
II.3.2.4. Напыление объектов	103

II.3.2.5. Приготовление срезов на ультрамикротоме	104
II.3.2.6. Метод отпечатков Пфистерера	104
II.3.3. Изучение грибов в тканях растений	105
 III. Культивирование микроскопических грибов (Е. А. Николь- ская)	 106
 III.1. Общие сведения	 106
III.2. Условия, необходимые для роста грибов	106
III.2.1. Питательные среды	107
III.2.1.1. Стерилизация питательных сред	109
III.3. Подготовка и хранение посевного материала некоторых гри- бов	110
III.3.1. Приготовление посевного материала для ферментации «темпе» выращиванием <i>Rhizopus oligosporus</i> на рисе . .	111
III.3.2. Подготовка посевного материала для получения грибного солода из культуры <i>Aspergillus oryzae</i>	111
III.3.3. Подготовка посевного материала гриба <i>Dendrodochium</i> <i>toxicum</i> на соломенной смеси	111
III.3.4. Подготовка посевного материала для получения глюкозо- оксидазы и каталазы из культуры <i>Penicillium vitale</i> Pi- dopl. et Bilai (штамм 1312/140 IV—V)	112
III.3.4.1. Подготовка посевного материала <i>P. vitale</i> на просе	112
III.3.4.2. Подготовка посевного материала <i>P. vitale</i> на пшене	112
III.3.5. Способы подготовки посевного материала грибов рода <i>Aspergillus</i>	115
III.3.6. Контроль посевного материала	116
III.3.6.1. Микробиологический контроль	116
III.3.6.2. Биохимический контроль	116
III.3.6.3. Определение всхожести спор	116
III.3.7. Хранение посевного материала	117
III.4. Культивирование грибов	117
III.4.1. Поверхностное культивирование	117
III.4.1.1. Культивирование на плотных неагаризованных средах	117
III.4.1.2. Культивирование на стандартных агаризованных средах	119
III.4.2. Погруженное, или глубинное, культивирование . . .	122
III.4.2.1. Культивирование в сосудах, встряхиваемых на поступа- тельной или вращательной качалке	123
III.4.2.2. Культивирование с барботажем через среду воздуха без механического перемешивания	124
III.4.2.3. Культивирование с барботажем через среду воздуха и механическим перемешиванием	124
III.4.2.4. Факторы, определяющие направленность ферментацион- ного процесса	126
III.4.2.5. Контроль процесса ферментации	127
III.4.3. Непрерывное культивирование	128
III.4.3.1. Гомогенные открытые системы	130
III.4.3.2. Гетерогенные открытые системы	132
III.4.3.3. Замкнутые системы	133
III.4.3.4. Полунепрерывные системы	134
III.4.3.5. Практическое применение методов непрерывного куль- тивирования грибов	134

IV. Определение роста и биосинтетической активности грибов (В. И. Билай)	138
IV.1. Общие сведения	138
IV.2. Морфологические параметры роста гифальных грибов . . .	139
IV.3. Фазы роста грибов	141
IV.4. Определение роста грибов	142
IV.4.1. Измерение линейного роста колоний	142
IV.4.2. Измерение плотности гиф колонии	144
IV.4.3. Измерение размеров клеток гиф колонии	145
IV.4.4. Исследование морфологических и цитологических измене- ний клеток гиф растущей колонии	145
IV.4.5. Определение роста по сухой массе мицелия	145
IV.4.6. Метод микрокультуры	146
IV.4.7. Определение роста по объему и числу клеток	146
IV.4.8. Определение интенсивности спорообразования	146
IV.5. Определение биосинтетической активности грибов	147
IV.5.1. Некоторые математические модели роста и биосинтеза . .	147
IV.5.2. Влияние продуктов метаболизма на скорость роста . . .	152
IV.5.3. Кинетические модели роста грибов	152
IV.5.3.1. Единица гифального роста	152
IV.5.3.2. Скорость роста колонии	154
IV.6. Определение количественных показателей биосинтетической активности грибов	154
IV.6.1. Экономический коэффициент	155
IV.6.2. Метаболический коэффициент	156
IV.6.3. Изучение метаболизма в клетках и их структурах	156
IV.6.3.1. Методы разрушения грибной клетки	157
IV.6.3.2. Фракционирование субклеточных фракций	157
IV.6.3.3. Дифференциальное центрифугирование	158
IV.6.3.4. Седиментационный анализ и другие методы контроля суб- клеточных фракций	159
IV.6.3.5. Ферментные методы контроля субклеточных фракций . .	160
IV.6.3.6. Метод ингибиторов	161
IV.6.3.7. Метод мутантов	162
IV.6.3.8. Метод радиоактивных изотопов	163
IV.6.3.9. Метод радиографии	163
V. Определение активности ферментов грибов (Т. И. Билай) . . .	165
V.1. Краткая характеристика и общие принципы изучения фермен- тов	165
V.1.1. Типы специфичности ферментов	165
V.1.2. Классификация ферментов	166
V.1.3. Единицы активности ферментов	166
V.1.4. Скорость ферментативных реакций	167
V.1.4.1. Зависимость скорости от времени	167
V.1.4.2. Влияние температуры	167
V.1.4.3. Влияние pH	167
V.1.5. Определение константы Михаэлиса	168
V.1.6. Определение ферментативной активности	169
V.1.6.1. Химические методы	169
V.1.6.2. Поляриметрические методы	169
V.1.6.3. Газометрические методы	170

V.1.6.4. Вискозиметрические методы	170
V.1.6.5. Хроматографические методы	170
V.1.6.6. Спектрофотометрические методы	170
V.2. Выделение и очистка ферментов	171
V.2.1. Некоторые общие принципы работы с ферментами	171
V.2.2. Выделение ферментов	171
V.2.3. Очистка ферментов	172
V.2.3.1. Фракционное осаждение органическими растворителями	173
V.2.3.2. Фракционное осаждение солями	173
V.2.3.3. Адсорбция	174
V.2.3.4. Жидкостная хроматография	174
V.2.3.5. Аффинная хроматография	174
V.2.3.6. Изоэлектрическое фокусирование	174
V.3. Определение активности пероксидазы, каталазы, глюкозо- оксидазы (В. Н. Борисова)	175
V.3.1. Ферменты — активаторы кислорода. Общие сведения	175
V.3.2. Оксидазные тесты	176
V.3.3. Определение активности пероксидазы	177
V.3.4. Определение активности каталазы	178
V.3.5. Экспресс-метод определения активности глюкозооксидазы	179
V.4. Определение активности целлюлаз (В. С. Сиверс, Е. Г. Му- сич, Ю. В. Лизак)	180
V.4.1. Общие сведения	180
V.4.2. Качественные методы определения целлюлаз	182
V.4.2.1. Визуальное определение роста грибов на фильтровальной бумаге	182
V.4.2.2. Определение состава сахаров в культуральной жидкости грибов методом круговой бумажной хроматографии	182
V.4.2.3. Образование зон просветления натрийкарбоксиметилцел- люлозного агара (Na-КМЦ)	183
V.4.2.4. Определение слоя разжижения геля Na-КМЦ	184
V.4.3. Количественные методы определения целлюлаз	184
V.4.3.1. Определение активности C_1 -фермента	184
V.4.3.2. Определение глубины осахаривания хлопка при длитель- ной инкубации	185
V.4.3.3. Определение активности C_1 -компонента целлюлазы по осахариванию фильтровальной бумаги	185
V.4.3.4. Определение активности C_x -ферментов	185
V.4.3.5. Осахаривающая способность C_x -ферментов	185
V.4.3.6. Эндоглюканазная активность C_x -ферментов	186
V.4.3.7. Определение β -глюкозидазной активности	186
V.4.4. Определение сахаров	186
V.4.4.1. Определение редуцирующих сахаров методом Шомодьи — Нельсона	186
V.4.4.2. Определение редуцирующих сахаров ортотолуидиновым реактивом	187
V.4.4.3. Определение глюкозы глюкозооксидазным методом	187
V.5. Определение активности ксиланаз (А. Я. Стрижевская)	
V.5.1. Общие сведения	188
V.5.2. Качественные методы определения ксиланаз	189
V.5.3. Количественные методы определения ксиланаз	189
V.5.3.1. Определение ксилозы методом Серенсена	190
V.6. Определение активности пектолитических ферментов (В. Л. Айзенберг)	191
V.6.1. Общие сведения	191

V.6.2. Качественные методы определения пектиназ	191
V.6.2.1. Определение наличия пектолитических ферментов мацерацией растительной ткани	192
V.6.2.2. Определение активности пектолитических ферментов по степени роста грибов	192
V.6.3. Количественные методы определения пектолитических ферментов	192
V.6.3.1. Определение активности пектинэстеразы	193
V.6.3.2. Определение совместного действия пектинэстеразы и полигалактуроназ	193
V.6.3.3. Определение экзополигалактуроназной активности . . .	195
V.6.3.4. Определение активности разжижающей эндополигалактуроназы	196
V.7. Определение активности некоторых ферментов, расщепляющих сахарозу (<i>Л. М. Кириллова</i>)	197
V.7.1. Общие сведения	197
V.7.2. Качественное определение продуктов расщепления сахарозы	198
V.7.2.1. Определение редуцирующих веществ в фильтратах культуральной жидкости	198
V.7.2.2. Определение сахаров в реакционной смеси после инкубации с отмытым мицелием	199
V.7.3. Количественные методы определения активности ферментов	199
V.7.3.1. Определение активности инвертазы	199
V.7.3.2. Определение активности сахарозофосфорилазы (сахарозоглюкозилтрансферазы)	201
V.7.3.3. Определение активности декстрансахаразы и амилосахаразы	201
V.7.3.4. Определение активности левансахаразы и инулазы . . .	202
V.8. Определение активности нуклеаз (<i>С. И. Безбородова</i>) . . .	202
V.8.1. Общие сведения	202
V.8.2. Среда для выращивания продуцентов нуклеаз	204
V.8.3. Определение активности рибонуклеаз	205
V.8.4. Определение активности нуклеаз, включая ДНКазы . . .	205
V.8.4.1. Нефелометрический метод определения нуклеаз	206
V.9. Определение активности протеаз (<i>Т. И. Билай</i>)	207
V.9.1. Определение протеолитических свойств грибов при первичном отборе	207
V.9.1.1. Определение желатиназных свойств	207
V.9.1.2. Определение казеинолитических свойств	208
V.9.1.3. Определение альбуминазной активности	208
V.9.1.4. Определение гемолитических свойств	208
V.9.1.5. Определение фибринолитических свойств	209
V.9.2. Определение молокосвертывающей активности	209
V.9.3. Вискозиметрический метод определения протеаз	209
V.9.4. Метод формольного титрования	210
V.9.5. Метод определения активности протеаз по приросту аминокислотного азота	210
V.9.6. Спектрофотометрический метод определения активности протеаз	211
V.10. Ферменты углеводного обмена (<i>А. М. Зайченко</i>)	212
V.10.1. Общие сведения	212
V.10.2. Краткая характеристика основных путей метаболизма углеводов	213

V.10.2.1. Гликолитический путь	213
V.10.2.2. Пентозофосфатный путь	214
V.10.2.3. Цикл трикарбоновых кислот	216
V.10.2.4. Глиоксилатный цикл	217
V.10.3. Определение активности ферментов углеводного обмена	218
V.10.3.1. Культивирование грибов	219
V.10.3.2. Подготовка мицелия	219
V.10.3.3. Дезинтеграция мицелия	219
V.10.3.4. Получение бесклеточных экстрактов	220
V.10.3.5. Методы определения активности некоторых ферментов	220
VI. Определение аминокислот и белка у грибов	225
VI.1. Определение аминокислот (<i>Л. А. Загороднец</i>)	225
VI.1.1. Общие сведения	225
VI.1.2. Метод распределительной хроматографии на бумаге	228
VI.1.2.1. Бумага	228
VI.1.2.2. Растворители	228
VI.1.2.3. Хроматографические камеры	229
VI.1.2.4. Определение значений R _f аминокислот	230
VI.1.2.5. Метчики	230
VI.1.2.6. Техника хроматографирования	230
VI.1.2.7. Проявители	231
VI.1.3. Подготовка исследуемого материала для хроматографического анализа	232
IV.1.3.1. Экстракция свободных аминокислот из мицелия	232
VI.1.3.2. Связанные аминокислоты мицелия	233
VI.1.3.3. Выделение и очистка фракции свободных аминокислот из культуральной жидкости	233
VI.1.4. Определение аминного азота	234
VI.1.5. Хроматографическое разделение аминокислот и их количественное определение	235
VI.1.5.1. Количественное определение аминокислот	235
VI.1.5.2. Определение пролина	236
VI.1.5.3. Определение метионина	236
VI.1.5.4. Определение триптофана	236
VI.2. Определение белков (<i>Т. Я. Метейко</i>)	237
VI.2.1. Тонкослойная хроматография	237
VI.2.2. Электрофорез	240
VI.2.2.1. Подготовка мицелия	241
VI.2.2.2. Приготовление буферных растворов	241
VI.2.3. Электрофорез на бумаге	242
VI.2.4. Электрофорез в агаровом геле	242
VI.2.5. Электрофорез в крахмальном геле	243
VI.2.6. Электрофорез в полиакриламидном геле	243
VI.2.7. Определение различных фракций мицелиальных белков	248
VI.2.8. Определение белка методом Лоури	249
VII. Определение нуклеотидного фонда грибов (<i>Д. Н. Черменский</i>)	250
VII.1. Общие сведения	250
VII.2. Ионообменная хроматография на колонке	251
VII,2.1. Подготовка и регенерация смолы	252

VII.2.2. Выделение нуклеотидов из мицелия	252
VII.2.3. Колоночная хроматография кислоторастворимых нуклеотидов	253
VII.3. Идентификация нуклеотидов	254
VII.3.1. Хроматография	254
VII.3.2. Спектрофотометрия	256
VII.3.3. Количественное определение нуклеотидов	256
VII.3.4. Определение положения фосфатной группы	257
VII.3.4.1. Хроматография на бумаге	257
VII.3.4.2. Реакция с орцином	257
VII.3.4.3. Реакция с карбазолом	258
VII.3.5. Идентификация нуклеотидсахаров	258
VII.4. Тонкослойная хроматография как метод изучения нуклеотидного фонда	259
VII.4.1. Микротонкослойная хроматография	259
 VIII. Определение коферментных витаминов у грибов (С. М. Щербина)	261
VIII.1. Общие сведения	261
VIII.2. Определение тиамина, биотина, пиридоксина, никотиновой и пантотеновой кислот микробиологическим методом	261
VIII.2.1. Индикаторные культуры	262
VIII.2.2. Приготовление среды для определения витаминов	262
VIII.2.3. Качественное определение	263
VIII.2.4. Количественное определение	264
VIII.3. Определение витамина В ₁₂ микробиологическим методом	265
VIII.3.1. Количественное определение	266
VIII.3.2. Биоавтографическое определение	267
VIII.4. Определение рибофлавина	267
VIII.4.1. Освобождение связанных форм рибофлавина из мицелия и их определение	268
VIII.4.2. Определение рибофлавина в культуральной жидкости	268
 IX. Изучение антибиотических свойств грибов (С. Н. Харченко)	269
IX.1. Общие сведения	269
IX.2. Выделение грибов-антагонистов из почвы	270
IX.2.1. Посев почвенной суспензии на элективные среды	270
IX.2.2. Метод скученной популяции на агаровой пластинке	270
IX.2.3. Прямая инокуляция комочками почвы	271
IX.2.4. Обогащение почвы	271
IX.3. Изучение антибиотических свойств грибов-антагонистов	271
IX.3.1. Выбор тест-микроорганизмов	271
IX.3.2. Определение антибиотической активности при культивировании на плотных средах	271
IX.3.2.1. Метод агаровых блоков	272
IX.3.2.2. Метод двойных пластинок	272
IX.3.3. Определение антибиотической активности при культивировании на жидких средах	272
IX.3.3.1. Метод бумажных дисков	273
IX.3.3.2. Метод желобка	273
IX.3.3.3. Метод висячей капли	273
IX.4. Количественное определение антибиотической активности	274

IX.4.1. Метод серийных разведений	274
IX.4.1.1. На жидкой среде	274
IX.4.1.2. На плотной среде	274
IX.4.2. Метод диффузии в агар	274
IX.4.2.1. Метод цилиндров	275
IX.4.2.2. Метод лунок	275
IX.5. Предварительная идентификация антибиотиков	275
IX.5.1. Идентификация по продуценту и спектру антимикробного действия	275
IX.5.2. Идентификация сборной хроматографией на бумаге	276
IX.5.2.1. Метод рН-бумажной хроматографии	277
IX.5.2.2. Метод круговой бумажной хроматографии	278
IX.5.3. Идентификация по устойчивым формам микроорганизмов	278
IX.5.4. Идентификация по качественным химическим реакциям	278
IX.6. Основные приемы выделения антибиотиков	279
IX.7. Отбор противовирусных антибиотиков	279
IX.7.1. Модели вирусов животных	279
IX.7.2. Культура ткани	280
IX.7.3. Модели растительных вирусов	280
IX.7.4. Модели фагов	280
IX.8. Отбор противоопухолевых антибиотиков	281
IX.8.1. Чашечный метод	281
IX.8.2. Использование микробов с пониженным дыханием	281
IX.8.3. Использование лабораторных животных	281
IX.9. Биохимическое изучение антибиотиков	282
IX.9.1. Ингибиторы синтеза клеточной оболочки бактерий	282
IX.9.1.1. Получение сферопластов из клеток кишечной палочки под действием пенициллина	283
IX.9.1.2. Определение уридиннуклеотидов в клетках стафилококка, культивируемого на среде с пенициллином	283
IX.9.2. Ингибиторы синтеза белка	283
IX.9.2.1. Действие хлоромидетина на включение в белки аминокислот в бесклеточной системе из кишечной палочки (по Рэнди и Очоа)	284
IX.9.3. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот	284
IX.9.3.1. Действие актиномицина D на ДНК-полимеразу кишечной палочки	284
IX.10. Определение антибиотиков в жидкостях организма и других субстратах микробиологическими методами	285
 X. Изучение токсинообразующих грибов (В. И. Билай, З. А. Курбацкая)	 287
X.1. Общие сведения	287
X.2. Токсико-микологическое исследование урожая, продуктов, кормов	288
X.2.1. Отбор проб	288
X.2.2. Органолептический анализ	289
X.2.3. Микологическое исследование кормов	289
X.2.3.1. Микроскопия смыва	290
X.2.3.2. Метод накопления	290
X.2.3.3. Выделение грибов из зерна	290

Х.2.3.4. Выделение грибов из силоса, жмыха и мучнистых кормов	291
Х.2.4. Определение токсичности зерна, продуктов, кормов, пораженных грибами	292
Х.2.4.1. Алиментарная проба на животных	292
Х.2.4.2. Кожная проба на кролике	292
Х.2.4.3. Глазная проба	294
Х.2.4.4. Проба на бородках кур	294
Х.2.4.5. Проба на мышах	294
Х.2.4.6. Химические методы определения токсичности кормов	294
Х.3. Определение токсигенных свойств грибов	295
Х.3.1. Культивирование грибов	295
Х.3.1.1. Культивирование грибов на естественных субстратах	296
Х.3.1.2. Культивирование грибов на жидких питательных средах	296
Х.3.1.3. Изоляция токсических веществ	297
Х.3.2. Биологические методы определения токсичности грибов	297
Х.3.2.1. Определение на простейших	297
Х.3.2.2. Определение на чувствительных микроорганизмах	298
Х.3.2.3. Определение на яйцах моллюсков	299
Х.3.2.4. Определение на рыбах	299
Х.3.2.5. Определение на сердце лягушки	300
Х.3.2.6. Определение на эмбрионах птиц	300
Х.3.2.7. Определение на клетках культуры тканей	301
Х.3.2.8. Определение на животных	303
Х.3.3. Патологическое действие некоторых микотоксинов	304
Х.3.3.1. Микотоксины, вызывающие поражение печени или почек в качестве первичного изменения	305
Х.3.3.2. Микотоксины, вызывающие поражение других органов и тканей	305
Х.3.4. Биохимическое действие микотоксинов	306
Х.3.4.1. Определение ингибиции синтеза белка клеток животных ниваленолом	306
Х.3.4.2. Ингибиция синтеза макромолекул в опухолевых клетках	307
Х.3.4.3. Ингибиция гликолиза в клетках опухоли	307
Х.3.4.4. Определение ингибиции синтеза белка токсинами с использованием ретикулоцитов кролика	307
Х.3.4.5. Действие афлатоксинов на мембраны лизосом	307
Х.3.5. Химические методы определения микотоксинов	308
Х.3.6. Хроматографические методы определения микотоксинов	309
Х.3.6.1. Биоавтографическое определение дендродохина методом сборной бумажной хроматографии	309
Х.3.6.2. Определение афлатоксинов и других микотоксинов методами тонкослойной и колоночной хроматографии	309
Х.3.6.3. Определение афлатоксинов в пораженных субстратах	310
Х.3.6.4. Количественное определение афлатоксинов методами тонкослойной и колоночной хроматографии	311
Х.3.6.5. Разделение дендродохинов колоночной и тонкослойной хроматографией	312
Х.3.6.6. Одновременное определение нескольких микотоксинов	312
Х.3.6.7. Определение эпокситрихотецена Т-2	313
Х.3.6.8. Определение зеараленона	314
Х.3.6.9. Определение охратоксинов	314
Х.3.7. Спектрофотометрический метод	314

XI. Идентификация алкалоидов (А. М. Безбородов)	316
XI.1. Питательные среды и методы культивирования	316
XI.2. Подготовка образцов для идентификации алкалоидов	317
XI.3. Качественные реакции на алкалоиды	317
XI.4. Исследования методом тонкослойной хроматографии	319
XII. Изучение фитотоксических свойств микроскопических грибов (О. А. Берестецкий)	321
XII.1. Определение фитотоксической активности культур микроскопических грибов	321
XII.1.1. Биопроба на семенах растений	322
XII.1.2. Биопроба на проростках кукурузы	322
XII.1.3. Биопроба на проростках плодовых и древесных растений	323
XII.1.4. Биопроба на листовых и стеблевых тканях проростков и вегетирующих растений	323
XII.1.5. Биопроба на дисках из листьев и изолированных листьях	323
XII.1.6. Биопроба на черенках и срезанных побегах растений	323
XII.1.7. Биопроба на хлорелле (<i>Chlorella vulgaris</i> L.)	324
XII.1.8. Биопроба на ряске (<i>Lemna minor</i> L.)	324
XII.1.9. Определение степени токсичности культуральной жидкости	324
XII.1.10. Определение специфичности действия фитотоксинов	324
XII.2. Изучение действия фитотоксинов на растительную клетку	325
XII.2.1. Действие фитотоксинов на протоплазму	325
XII.2.1.1. Действие фитотоксинов на движение протоплазмы	325
XII.2.1.2. Действие фитотоксинов на цитоплазматическую мембрану клетки и стенки вакуолей	325
XII.2.2. Действие фитотоксинов на митотическую активность меристематических тканей	325
XII.2.3. Действие фитотоксинов на растяжение клеток	326
XII.3. Изучение действия фитотоксинов на растения методом культуры изолированных тканей и органов	326
XII.3.1. Культура изолированных тканей	326
XII.3.2. Культура изолированных корней	327
XII.3.3. Культура изолированных листьев	328
XII.4. Методы изучения поступления фитотоксинов в растения.	328
XII.5. Определение фузариевой кислоты у грибов (Л. А. Богомолова)	329
XII.5.1. Общие сведения	329
XII.5.2. Культивирование грибов	330
XII.5.3. Выделение фузариевой кислоты	330
XII.5.4. Определение фузариевой кислоты	331
XII.5.4.1. Метод бумажной хроматографии	331
XII.5.4.2. Тонкослойная хроматография	332
XII.5.4.3. Биологические методы определения фузариевой кислоты	332
XII.5.5. Токсичность фузариевой кислоты	332
XIII. Изучение природы фитотоксических веществ микроскопических грибов (О. А. Берестецкий, В. Ф. Патыка)	334
XIII.1. Выбор растворителя	334
XIII.1.1. Метод растительных тестов	335
XIII.1.2. Метод микробных тестов	335

XIII.2. Выделение фитотоксических веществ	336
XIII.2.1. Лиофилизация, или вакуумная сушка	336
XIII.2.2. Экстракция	336
XIII.3. Разделение и очистка фитотоксических веществ	337
XIII.3.1. Последовательная обработка выделенной смеси различными растворителями	338
XIII.3.2. Распределение веществ между двумя несмешивающимися растворителями	338
XIII.3.3. Хроматография	339
XIII.3.3.1. Хроматография на бумаге	339
XIII.3.3.2. Хроматография на колонке	339
XIII.3.3.3. Тонкослойная хроматография	340
XIII.3.3.4. Газовая хроматография	341
XIII.3.4. Кристаллизация	341
XIII.4. Идентификация фитотоксических веществ	342
XIII.4.1. Определение температуры плавления по Кофлеру	342
XIII.4.2. Элементарный анализ фитотоксических веществ	342
XIII.4.2.1. Определение углерода и водорода	342
XIII.4.2.2. Определение азота	343
XIII.4.3. Определение молекулярной массы фитотоксических веществ	343
XIII.4.4. Методы спектрального анализа	343
 XIV. Изучение генетики грибов (<i>М. М. Левитин</i>)	 345
XIV.1. Общие сведения	345
XIV.2. Методы мутационного анализа	345
XIV.2.1. Приготовление суспензии клеток грибов	346
XIV.2.2. Обработка мутагеном и подбор оптимальных доз для индукции мутантов	346
XIV.2.3. Посев обработанной мутагеном суспензии	347
XIV.2.4. Отбор морфологических мутантов	347
XIV.2.5. Отбор биохимических мутантов	347
XIV.2.6. Идентификация ауксотрофных мутантов	348
XIV.2.7. Отбор физиологических мутантов	350
XIV.2.8. Определение частоты появления мутантов	350
XIV.3. Методы гибринологического анализа	351
XIV.3.1. Анализ гибридов при половом размножении	351
XIV.3.1.1. Получение гибридов	351
XIV.3.1.2. Выделение гибридного потомства	352
XIV.3.1.3. Анализ расщепления в потомстве гибридов	353
XIV.3.2. Анализ гибридов при бесполом размножении	355
XIV.3.2.1. Получение гетерокариотичных форм	355
XIV.3.2.2. Выделение диплоидов	355
XIV.3.2.3. Отбор рекомбинантов	356
XIV.3.2.4. Анализ митотической рекомбинации	356
 XV. Генетика взаимоотношений паразита и растения-хозяина (<i>Л. А. Михайлова, И. Г. Одинцова, О. С. Афанасенко</i>)	 358
XV.1. Общие сведения	358
XV.2. Сбор и хранение инфекционного материала	360
XV.3. Клонирование популяций	360

XV.3.1. Выделение клонов возбудителя бурой ржавчины пшеницы	360
XV.3.2. Выделение клонов возбудителя сетчатой пятнистости ячменя	360
XV.3.3. Размножение спор клонов возбудителя бурой ржавчины пшеницы	362
XV.3.4. Размножение спор клонов возбудителя гельминтоспориозов злаков	363
XV.4. Анализ популяций паразитов по вирулентности к дифференцирующим наборам линий и сортов	364
XV.4.1. Определение вирулентности клонов возбудителя бурой ржавчины пшеницы к набору изогенных линий	364
XV.4.2. Определение вирулентности клонов возбудителя сетчатой пятнистости ячменя к набору сортов-дифференциаторов	365
XV.5. Исследование мутационного процесса	366
XV.5.1. Выделение спонтанных вирулентных мутантов возбудителя бурой ржавчины пшеницы и определение частоты их встречаемости в популяции	367
XV.5.2. Получение индуцированных мутантов возбудителя бурой ржавчины пшеницы	367
XV.5.2.1. Обработка спор химическими мутагенами на примере N-нитрозо-N-метилмочевины	367
XV.5.2.2. Определение количества живых спор, посеянных на газон	368
XV.5.2.3. Учет выживаемости спор и частоты появления мутантов	368
XV.5.2.4. Обработка спор УФ-лучами	368
XV.6. Оценка сортов растений-хозяев на устойчивость	368
XV.6.1. Оценка специфической устойчивости сортов пшеницы к возбудителю бурой ржавчины	369
XV.6.2. Оценка специфической устойчивости ячменя к возбудителю сетчатой пятнистости	369
XV.6.3. Оценка неспецифической устойчивости растений и агрессивности штаммов гриба	369
XV.6.3.1. Оценка неспецифической устойчивости к бурой ржавчине	370
XV.6.3.2. Оценка агрессивности штаммов возбудителя бурой ржавчины и сетчатой пятнистости ячменя	371
XV.7. Генетический анализ устойчивости растений	371
XV.7.1. Инфекционный материал для гибридологического анализа	372
XV.7.2. Гибридологический анализ устойчивости	372
XV.7.3. Идентификация генов устойчивости	373
XV.7.3.1. Установление отличий от известных генов устойчивости по фитопатологическим тестам	373
XV.7.3.2. Установление аллельных отношений с известными генами устойчивости	374
XV.7.3.3. Упрощенный вариант клонового анализа популяций гриба для выделения клонов с редкими аллелями авирулентности	374
 XVI. Отношение грибов к свету, ультрафиолетовым лучам и ионизирующим излучениям (Н. Н. Жданова, А. И. Василевская)	 376
XVI.1. Общие сведения	376
XVI.2. Методы изучения действия видимого света на грибы . . .	376
XVI.2.1. Источники видимого света	376

XVI.2.2. Основные методические приемы, используемые при освещении грибов	377
XVI.2.3. Методы изучения действия УФ-лучей на грибы	378
XVI.2.3.1. Физическая характеристика, источники излучения, единицы измерения, дозиметрия	378
XVI.2.3.2. Расчет интенсивности светового потока лампы БУВ-15	379
XVI.2.3.3. Облучение водной стандартизованной взвеси спор	379
XVI.2.3.4. Облучение спор в сухом состоянии	380
XVI.2.3.5. Изучение явлений фотореактивации и темновой репарации грибов, облученных УФ-лучами (по критерию выживаемости)	382
XVI.3. Ионизирующие излучения	383
XVI.3.1. Общие сведения	383
XVI.3.2. Методы изучения действия ионизирующих излучений на грибы	383
XVI.3.2.1. Источники излучения, поглощенная доза облучения, единицы ее измерения	383
XVI.3.2.2. Основные методы облучения грибных спор	384
XVI.4. Понятие радиочувствительности, критерии	385
XVI.4.1. Построение дозных кривых выживаемости	386
XVI.4.2. Типы дозных кривых выживаемости	387
XVI.5. Изучение процесса пострadiационного восстановления	388
XVI.5.1. Метод однократного облучения	388
XVI.5.2. Метод фракционированного облучения	389

XVII. Методы медицинской микологии (П. Н. Кашкин) 390

XVII.1. Задачи и условия работы	390
XVII.1.1. Характеристика микозов и их клинического проявления	390
XVII.1.2. Возбудители микозов и условия их изучения	390
XVII.2. Сбор, обработка и пересылка материалов для исследования	392
XVII.2.1. Изоляция грибов из пораженных тканей	392
XVII.2.2. Хранение и пересылка патологического материала и культур	393
XVII.3. Микроскопия грибов в нативных и окрашенных препаратах	394
XVII.3.1. Подготовка патологического материала для микроскопического исследования	394
XVII.3.2. Окраска грибов из кожных и ногтевых поражений	394
XVII.3.3. Окраска по Граму и Цилю — Нильсену	394
XVII.3.4. Окраска по Романовскому — Гимза	395
XVII.4. Получение чистых культур	395
XVII.5. Выделение возбудителей микозов из почвы	396
XVII.5.1. Выделение дерматофитов	396
XVII.5.2. Выделение возбудителей бластомикозов	397
XVII.6. Культивирование патогенных грибов	397
XVII.6.1. Метод культивирования в висячей капле	398
XVII.6.2. Культивирование на предметных стеклах по Ривалье и Зейделю	398
XVII.6.3. Выращивание грибов в тонком слое агара на стекле	398
XVII.6.4. Культивирование грибов на агаровых блоках	398
XVII.6.5. Другие методы культивирования	399
XVII.7. Изучение морфологии и биологии патогенных грибов	400

XVII.7.1. Изучение морфологии	400
XVII.7.2. Изучение биохимической активности	400
XVII.7.2.1. Выращивание дерматофитов на волосах по Венбрейзег-хему	401
XVII.7.2.2. Определение кератинолитической активности грибов	402
XVII.8. Экспериментальное заражение животных грибами	402
XVII.8.1. Методы заражения экспериментальных животных	403
XVII.8.2. Методы определения патогенности грибов	405
XVII.9. Серологические реакции	406
XVII.9.1. Взятие крови, получение и пересылка сывороток	406
XVII.9.2. Реакция агглютинации	407
XVII.9.3. Реакция гемагглютинации	407
XVII.9.4. Реакция кольцепреципитации	408
XVII.9.5. Реакция преципитации в агаровом геле	408
XVII.9.6. Реакция связывания комплемента (РСК)	409
XVII.9.7. Реакция иммунолюминесценции	410
XVII.9.8. Получение иммунных сывороток	410
XVII.10. Антигены	411
XVII.10.1. Методы получения грибных антигенов и аллергенов	412
XVII.10.1.1. Метод Плято — Нейссера	412
XVII.10.1.2. Получение антигенов по Буавену и Месробеану	413
XVII.10.1.3. Фенольный метод Коникова	413
XVII.10.1.4. Получение антигенов при обработке клеток мочевиной	413
XVII.10.1.5. Получение антигенов при обработке клеток β -нафтолом	414
XVII.10.1.6. Метод выделения ультразвуковых антигенов	414
XVII.10.2. Метод получения биомассы тканевых форм некоторых диморфных грибов	414
XVII.11. Выявление микогенной сенсибилизации	415
 XVIII. Основные микологические методы в фитопатологии (В. И. Билай, И. А. Элланская)	 418
XVIII.1. Общие сведения о заболеваниях растений, вызываемых грибами	418
XVIII.2. Категории паразитических свойств возбудителей	420
XVIII.3. Свойства патогенных организмов	421
XVIII.4. Возникновение и развитие патологического процесса	421
XVIII.5. Обнаружение грибов в тканях растений	421
XVIII.5.1. Обнаружение мицелия пыльной головки в зародышах	422
XVIII.5.2. Обнаружение мицелия пыльной головки в проростках	422
XVIII.5.3. Определение проникновения и локализации <i>Verticillium dahliae</i> - возбудителя увядания в проростках хлопчатника	422
XVIII.6. Учет болезни	423
XVIII.7. Выделение фитопатогенных грибов	423
XVIII.7.1. Выделение фитопатогенных грибов из разных органов растения	424
XVIII.7.1.1. Выделение из корней	424
XVIII.7.1.2. Выделение из пораженной ткани	425
XVIII.7.1.3. Выделение из сосудистой системы	425
XVIII.7.1.4. Выделение из стеблей и листьев	425
XVIII.7.1.5. Выделение из зерна хлебных злаков и семян	425
XVIII.7.1.6. Выделение из клубней, луковиц, корнеплодов	425

XVIII.7.2. Селективные, или «приманочные», методы	426
XVIII.7.3. Метод элективного выделения специфических видов	426
XVIII.7.4. Метод «контактных стекол»	426
XVIII.8. Поддержание чистых культур	426
XVIII.9. Культивирование патогенов	426
XVIII.10. Специализация фитопатогенных грибов	427
XVIII.10.1. Специализированные формы и расы	427
XVIII.11. Методы искусственного заражения	428
XVIII.12. Биологические свойства возбудителей	430
XIX. Выделение грибов из природных субстратов	432
XIX.1. Выделение почвенных грибов в чистые культуры (<i>Т. С. Кириленко</i>)	432
XIX.1.1. Общие сведения	432
XIX.1.2. Выделение грибов из почвы	432
XIX.1.2.1. Выделение грибов на селективные среды	432
XIX.1.2.2. Метод почвенных разведений	433
XIX.1.2.3. Метод прямого посева почвы	434
XIX.1.2.4. Метод прямых отпечатков почвенной пробы	435
XIX.1.2.5. Электростатический метод выделения грибов	435
XIX.1.2.6. Метод выделения грибов на растительные остатки	435
XIX.1.2.7. Метод фумигации почвы	435
XIX.1.2.8. Метод тепловой обработки почвы	436
XIX.1.2.9. Метод приманки	436
XIX.1.3. Выделение грибов с корней растений и других растительных остатков	437
XIX.1.3.1. Метод водных смывов	437
XIX.1.3.2. Метод получения спор сухоспоровых сумчатых грибов	437
XIX.1.4. Учет грибов	439
XIX.2. Выделение морских грибов-сапрофитов из классов <i>Ascomycetes</i> и <i>Deuteromycetes</i> (<i>Fungi imperfecti</i>) (<i>И. А. Дудка</i>)	441
XIX.2.1. Общие сведения	441
XIX.2.2. Сбор морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся на древесине	442
XIX.2.3. Выделение и получение чистых культур морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся на древесине	443
XIX.2.3.1. Предварительная обработка панелей	443
XIX.2.3.2. Выделение грибов с панелей древесины на питательные среды	444
XIX.2.4. Выделение и получение чистых культур сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на гниющих листьях древесных пород	445
XIX.2.5. Выделение и получение чистых культур сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на морских водорослях-макрофитах и высших растениях	445
XIX.2.5.1. Сбор водорослей-макрофитов для выделения морских сумчатых и несовершенных грибов	446
XIX.2.5.2. Выделение чистых культур сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на морских водорослях-макрофитах	446
XIX.2.5.3. Сбор высших растений для установления видового состава морских сумчатых и несовершенных грибов	447

XIX.2.6. Культивирование морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов	447
XIX.2.6.1. Питательные среды для выделения и массового культивирования морских грибов	447
XIX.3. Чистая культура высших базидиальных грибов (<i>А. С. Бухало</i>)	448
XIX.3.1. Выделение чистых культур	448
XIX.3.1.1. Выделение чистых культур из плодовых тел	448
XIX.3.1.2. Выделение чистых культур из базидиоспор	450
XIX.3.1.3. Идентификация высших базидиальных грибов в культуре	453
XIX.3.2. Культивирование высших базидиальных грибов на жидких средах	459
XIX.3.2.1. Метод поверхностного культивирования	459
XIX.3.2.2. Метод погруженного культивирования	460
 XX. Хранение культур грибов (<i>Т. И. Редчиц</i>)	 462
XX.1. Общие сведения	462
XX.2. Методы хранения культур грибов	463
XX.2.1. Хранение на агаризованных средах	463
XX.2.1.1. Периодические пересевы	463
XX.2.1.2. Хранение под вазелиновым маслом	464
XX.2.2. Хранение на естественных субстратах	465
XX.2.2.1. Хранение на пшене (зерне)	465
XX.2.2.2. Хранение в стерильной почве	466
XX.2.2.3. Хранение в кварцевом песке	466
XX.2.3. Хранение культур в высушенном состоянии	466
XX.2.3.1. Хранение на безводном силикагеле (метод Перкинса)	467
XX.2.3.2. Лиофилизация	467
XX.2.4. Криогенный метод хранения	469
XX.2.5. Другие методы хранения	470
XX.3. Методы контроля хранения культур грибов	471
XX.3.1. Определение остаточной влажности	471
XX.3.2. Определение процента выживаемости	472
XX.3.3. «Оживление» культур и восстановление некоторых утраченных признаков	472
 Приложения	 474
Приложение 1. Основные реактивы, применяемые в химических цветовых реакциях при изучении <i>Basidiomycetes</i> (<i>В. П. Вассер</i>)	474
Приложение 2. Перечень красителей, применяемых при микроскопическом изучении грибов (<i>Э. З. Коваль, Л. Т. Горбик</i>)	477
Приложение 3. Характеристика наиболее распространенных лабораторных установок для ферментации аэробных микроорганизмов (<i>Е. А. Никольская</i>)	478
Приложение 4. Рекомендации по единому обозначению процесса непрерывного культивирования (<i>Е. А. Никольская</i>)	480
Приложение 5. Основные рабочие и буферные растворы, используемые для разделения белков (рН 8,9; 7%-ный раствор геля) (<i>Т. Я. Метейко</i>)	481

П р и л о ж е н и е 6. Характерные качественные химические реакции антибиотиков, продуцируемых пенициллами и аспергиллами (С. Н. Харченко)	483
П р и л о ж е н и е 7. Основные питательные среды для культивирования патогенных грибов (П. Н. Кашкин)	485
П р и л о ж е н и е 8. Основные питательные среды для культивирования фитопатогенных грибов (В. И. Билай, И. А. Элланская)	486
П р и л о ж е н и е 9. Основные питательные среды для культивирования морских грибов (И. А. Дудка)	487
П р и л о ж е н и е 10. Основные питательные среды для получения плодовых тел (I) и мицелия (II) высших базидиомицетов в культуре (А. С. Бухало)	489
Список литературы	491
Предметный указатель	532
Указатель латинских названий	544

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АДФ	—	аденозиндифосфорная кислота
АМФ	—	аденозинмонофосфорная кислота
АТФ	—	аденозинтрифосфорная кислота
БИС	—	N,N'-метилден-бис-акриламид
ГДФ	—	гуанозиндифосфорная кислота
ГК	—	глиоксиловая кислота
ГМФ	—	гуанозинмонофосфорная кислота
ГТФ	—	гуанозинтрифосфорная кислота
ДИДА	—	дикетогидринделидендикетогидриндиамина
ДМ	—	деминерализованная вода
ДНК	—	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКза	—	дезоксирибонуклеаза
ДЭАЭ	—	диэтиламиноэтилцеллюлоза
ИК	—	инфракрасный
ИЭТ	—	изоэлектрическая точка
КМЦ	—	карбоксиметилцеллюлоза
МПА	—	мясо-пейтонный агар
МПБ	—	мясо-пептонный бульон
НАД ⁺	—	никотинамидадениндинуклеотид
НАД · Н	—	восстановленный НАД
НАДФ ⁺	—	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФ · Н	—	восстановленный НАДФ
НК	—	нуклеиновая кислота
ПГА	—	полигалактуроназная активность
П _к А	—	пектолитическая активность
ПГС	—	полигалактуроназная способность, определяемая вискозиметрически
ПФП	—	пентозофосфатный путь превращения углеводов
ПЭА	—	пектинэстеразная активность
ПЭИ	—	полиэтиленминцеллюлоза
РНК	—	рибонуклеиновая кислота
РНКаза	—	рибонуклеаза
ТПФ	—	тиаминпирофосфат
Трис	—	2-амино-2(гидроксиметил)-1,3-пропандиол
ТСХ	—	тонкослойная хроматография
ТХУ	—	трихлоруксусная кислота
ТЭМЭД	—	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
УДФ	—	уридиндифосфорная кислота

УДФГ — уридиндифосфатглюкоза
УМФ — уридинмонофосфорная кислота
УТФ — уридинтрифосфорная кислота
УФ — ультрафиолетовый
ФАД⁺ — флавинадениндинуклеотид
ФАДН — восстановленная форма ФАД
ФЭК — фотоэлектрокалориметр
ЦДФ — цитидиндифосфорная кислота
ЦМФ — цитидинмонофосфорная кислота
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот
ЩУК — щавелевоуксусная кислота
ЩЯК — щавелевоянтарная кислота
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат
ЭМП — гликолитический путь превращения

I. ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ МОРФОЛОГИИ ГРИБОВ

I.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

«Систематика с полным основанием может быть названа математикой биологии: любое биологическое исследование должно сопровождаться точным знанием систематической принадлежности исследуемого объекта, без чего любой биологический факт теряет необходимую точность» [175]. До последнего времени основным методом определения систематической принадлежности грибов остается классический сравнительно-морфологический метод. Он неисчерпаем и занимает ведущее место среди методов, используемых для изучения грибных организмов.

Изучение элементов морфологии макро- и микроструктур грибов является наиболее существенным в сложной цепи определения таксономической принадлежности объекта. Для идентификации низших грибов помимо выяснения особенностей морфологического строения важное значение имеет установление типа полового и бесполого размножения, в зависимости от которого исследуемый организм относят к тому или иному крупному таксону в ранге класса, порядка, иногда семейства. Учитывая эту особенность, в данном разделе приведены не только данные о морфологии талломов и других органов низших грибов, но и характеристика типов полового и бесполого размножения и чередования поколений (для тех низших грибов, у которых это явление четко выражено).

I.2. НИЗШИЕ ГРИБЫ

Низшие грибы, объединяющие представителей классов Chytridiomycetes, Hyphochytriomycetes, Oomycetes, Zygomycetes и Trichomycetes, характеризуются значительной спецификой морфологического строения по сравнению с высшими грибами, относящимися к классам Ascomycetes, Basidiomycetes и Deuteromycetes (группа Fungi imperfecti) [51, 162, 176, 245, 320].

I.2.1. КЛАСС CHYTRIDIOMYCETES

I.2.1.1. ЭЛЕМЕНТЫ МОРФОЛОГИИ ТАЛЛОМА

Вегетативное тело представителей этого класса слабо развитое; у некоторых, наиболее примитивных (порядок Chytridiales, семейства Olpidiaceae и Sypchytriaceae), оно имеет вид голого амебоида и

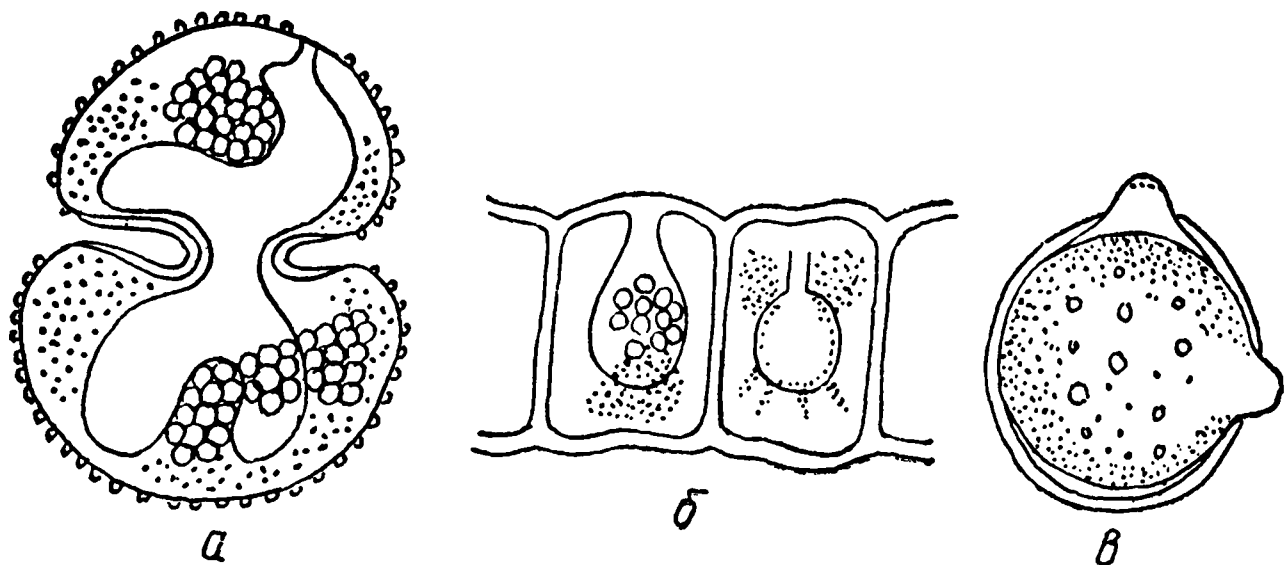


Рис. 1. Эндобиотические талломы и образовавшиеся из них зооспорангии хитридиомицетов в клетках водорослей:

а — пустой зооспорангий *Olpidium utriculiforme* Scherffel в клетке водоросли *Cosmarium*; *б* — зооспорангий и шиповатая покоящаяся спора *Olpidium hyalothecae* Scherffel в клетках водоросли *Hyalotheca*; *в* — зооспорангий *Olpidium gregarium* Nowak., Schroeter с выводковой папиллой в яйце коловратки.

находится в клетке растения-хозяина, у более высокоорганизованных представителей (порядок Мопоблефариды) вегетативное тело представлено многоядерным разветвленным неклочным мицелием [578, 639, 751, 783].

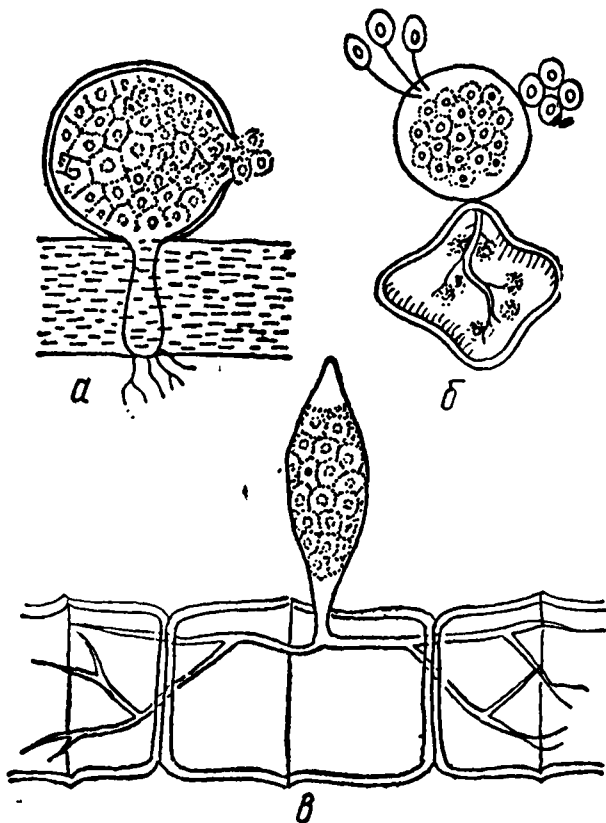


Рис. 2. Эпibiотические талломы и образовавшиеся из них зооспорангии хитридиомицетов на клетках водорослей:

а — спорангий *Rhizophydium karlingii* Sparrow с выходящими зооспорами на водоросли *Ulothrix*; *б* — спорангий *Rhizophydium cyclotellae* Zopf. с выходящими из него зооспорами на водоросли *Cyclotella*; *в* — зрелый спорангий *Rhizophydium fusum* (Zopf.) Fischer на водоросли *Melosira*.

Бесполое размножение осуществляется зооспорами с одним гладким бичевидным жгутиком, прикрепленным к заднему концу. После определенного периода движения зооспора оседает на соответствующем субстрате (или клетке растения-хозяина), теряет жгутик и различными способами превращается в вегетативное тело гриба. У многих видов, паразитирующих внутри клетки организма-хозяина, содержимое зооспоры переходит туда по специальному каналу с образованием *эндобиотического* таллома (рис. 1). У некоторых хитридиомицетов, паразитирующих на поверхности клетки организма-хозяина, зооспора покрывается оболочкой и остается сверху, а внутрь клетки хозяина внедряет только систему разветвленных ризоидов. Такой таллом называется *эпibiотическим* (рис. 2). Талломы сапрофитных видов в зависимости от места их образования (в субстрате или на поверхности) называются *интраматричными* и *экстраматричными*. Известны хитридиомицеты, у которых зооспора переходит в стадию вегетативного тела, не прикрепляясь к субстрату, прямо в воде (порядок Chytridiales, семейство Rhizidiaceae), а затем из вегетативного тела

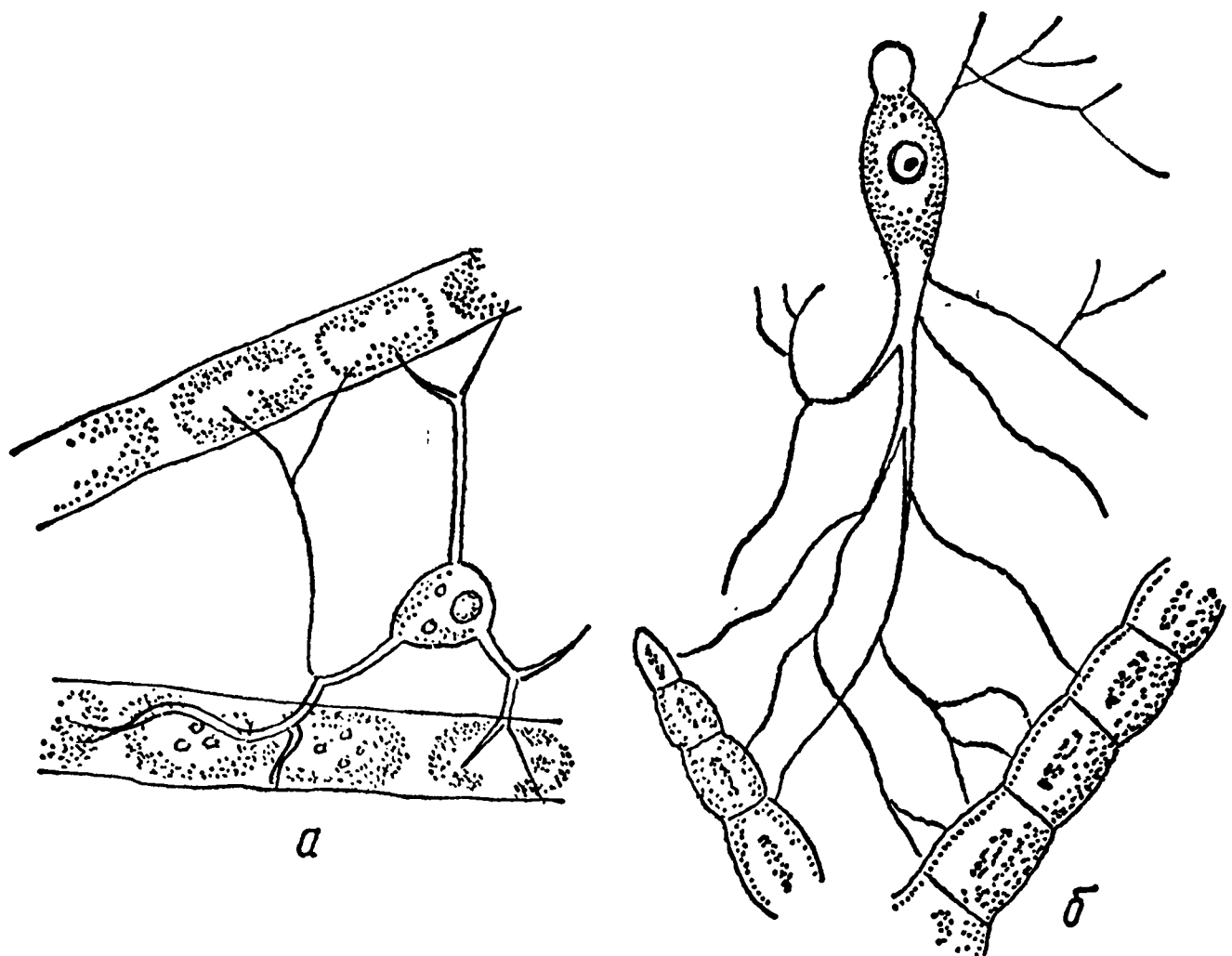


Рис. 3. Интерматрикальные талломы хитридиомицетов:
а — таллом *Polyphagus parasiticus* Nowak. на водоросли *Tribonema*;
б — одноядерный таллом *Sporophlyctis rostrata* Serbinow с ризоидами на водоросли *Draparnaldia*.

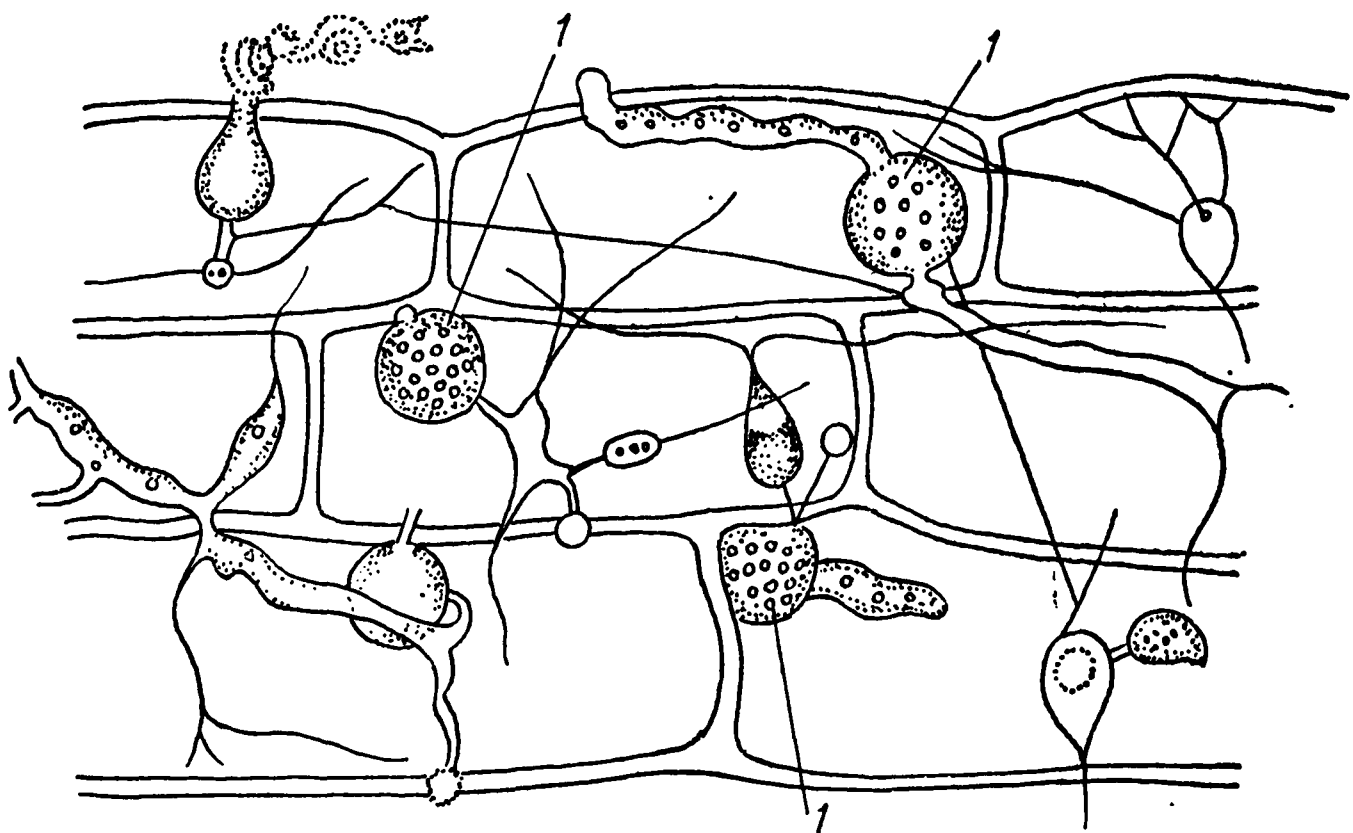


Рис. 4. Полицентрические талломы хитридиомицетов *Cladochytrium tenuae* Nowak. в клетках гниющих тканей *Acorus calamus*:
1 — собирательные клетки.

вырастают довольно длинные ризоиды, которыми грибной организм прикрепляется к взвешенным в толще воды водорослям или беспозвоночным. Такие талломы называются *интерматрикальными*, или *интербиотическими* (рис. 3).

У большинства хитридиомицетов имеется только одно ядро в центральной части таллома, тогда как в ризоидах ядра отсутствуют. Такой

таллом называется *моноцентрическим*. Однако известны виды хитридиомицетов с *полицентрическими* талломами. Таллом такого типа характерен, например, для *Cladochytrium tenuae* Nowakowski, развивающегося на гниющих тканях высших водных растений (порядок Chytridiales, семейство Cladochytriaceae). Зооспора этого гриба на соответствующем субстрате покрывается оболочкой и внедряет в ткань хозяина гифу ризомицелия. На конце этой гифы возникает вздутие (собираательная клетка), в которое переходит ядро зооспоры. Ядро делится на два, и между ними образуется перегородка. При этом гифа продолжает свой рост, вновь образуется вздутие, в которое переходит одно из ядер (ядро дистальной клетки), и процесс повторяется. Так образуются полицентрические талломы (рис. 4).

1.2.1.2. БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Зооспоры развиваются обычно в шаровидных или грушевидных, реже в удлинённых, цилиндрических зооспорангиях [522, 706]. При созревании протоплазма зооспорангиев распадается на отдельные участки, образуя различное количество зооспор, от одной до нескольких сотен и более. Одножгутиковые зооспоры обычно выходят из зооспорангия через специальную пору, которая часто образуется на верхушке специальной выводковой трубки. У оперкулятных видов

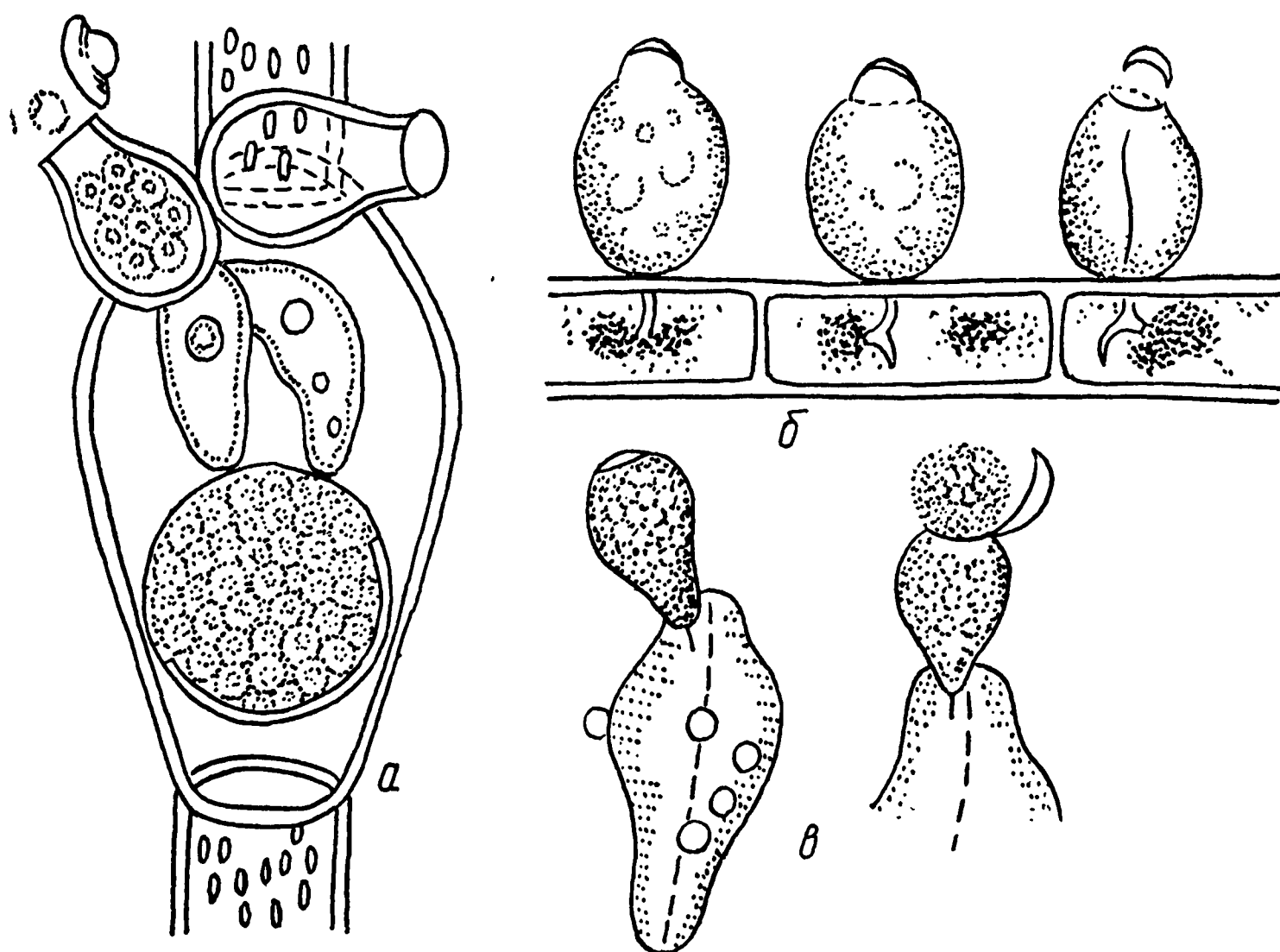


Рис. 5. Зооспорангии оперкулятных хитридиомицетов, раскрывающиеся крышечкой:

а — зооспорангии *Chytridium olla* Braun с открытыми крышечками на оогониях водоросли *Oedogonium*; б — зооспорангии *Chytridium papillatum* Sparrow на разных стадиях развития на водорослевой нити; в — зооспорангии *Chytridium versatile* Scherffel на разных стадиях развития на водоросли *Navicula*.

порядка Chytridiales зооспорангии снабжены специальной крышечкой (рис. 5), закрывающей пору, через которую выходят зооспоры. При определенных условиях зооспоры, не выходя из зооспорангия, покрываются оболочками (инцистируются) и прямо в зооспорангии прорастают ростковыми трубками. У некоторых хитридиомицетов протоплазма зооспорангия выходит через выводковую трубку в виде пузыря, окруженного тонкой оболочкой, — *проспорангия*. В нем образуются зооспоры, которые через разрыв в оболочке выходят наружу.

У наиболее примитивных хитридиомицетов (порядок Chytridiales, семейства Olpidiaceae и Synchytriaceae) одноклеточное тело полностью превращается в спорангий (*голокарпический таллом*). У более высокоорганизованных хитридиомицетов (порядок Chytridiales, семейства Phlyctidiaceae, Rhizidiaceae, Cladochytriaceae и др.) спорангии образуются из части вегетативного тела (*эукарпический таллом*). Среди хитридиомицетов есть виды, у которых зооспорангии и гаметангии, развивающиеся на вегетативном теле, обособлены от несущей гифы настоящими перегородками (порядок Monoblepharidales).

1.2.1.3. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

У самых примитивных хитридиомицетов наблюдается наиболее простой тип полового процесса, заключающийся в слиянии двух неспециализированных клеток (мерогамия и гологамия). *Мерогамия* представляет собой слияние одножгутиковых подвижных клеток, которые ничем не отличаются от зооспор (порядок Chytridiales, некоторые виды семейств Olpidiaceae, Synchytriaceae, Phlyctidiaceae, Physodermataceae и др.). *Гологамия* заключается в слиянии двух только что образовавшихся из зооспор вегетативных тел (порядок Chytridiales, семейства Olpidiaceae, Phlyctidiaceae, Rhizidiaceae и др.).

Для более высокоорганизованных представителей хитридиомицетов характерны дифференциация половых органов и постепенное усложнение полового процесса. Здесь отмечены различные типы гаметогамии: *изогамия*, *гетерогамия* и *оогамия*.

В результате полового процесса у многих хитридиомицетов образуются покоящиеся споры, покрытые утолщенной бугорчатой, шиповатой, реже гладкой оболочкой. Поскольку в ряде случаев половое происхождение этих спор точно не установлено, к ним не применяют термины ооспоры или зигоспоры.

1.2.1.4. ЧЕРЕДОВАНИЕ ЦИКЛОВ ПОЛОВОГО И БЕСПОЛОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

В ряде групп хитридиомицетов (порядок Chytridiales, семейство Physodermataceae; порядок Blastocladales) известно два типа чередования полового и бесполого поколений — *изоморфный* и *гетероморфный*. У видов с изоморфным чередованием поколений спорофит и гаметофит сходны по внешнему виду и степени развития. При прорастании покоящихся спор происходит редукционное деление и образуются гаплоидные зооспоры. Они дают гаплоидные половые формы (*гаметофит*) с микро- и макрогаметангиями. Выходящие из них гаметы копулируют и образуют *планозиготы*, которые затем теряют жгутики и превращаются в диплоидные формы (*спорофит*), идентичные по форме и размерам гаметофиту. На спорофитах развиваются зооспорангии и покоящиеся споры (цисты). В зооспорангиях образуются диплоидные зооспоры, из которых развиваются новые спорофиты.

При прорастании покоящихся спор происходит редукционное деление; выходящие из них зооспоры гаплоидны. Они дают начало гаплоидному гаметофиту.

У видов с гетероморфным чередованием поколений спорофит и гаметофит отличаются друг от друга по внешнему виду и степени развития.

1.2.2. КЛАСС HYPHOSHYTRIOMYCETES

1.2.2.1. ЭЛЕМЕНТЫ МОРФОЛОГИИ ТАЛЛОМА

Талломы гиfoxитриальных грибов эндобиотические или эпibiотические, интраматрикальные или экстраматрикальные, голокарпические или эукарпические, моноцентрические или полицентрические; вегетативное тело состоит из системы ризоидов и гиfoxоподобных образований с интеркалярными вздутиями [265].

1.2.2.2. БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Бесполое размножение осуществляется зооспорами с одним перистым жгутиком, прикрепленным к переднему концу. Зооспоры слегка удлинённые, грушевидные или обратногрушевидные, булавовидные, овальные, округлые или яйцевидные, часто содержат маленькое боковое рефрактивное тело, расположенное у заднего конца. Образуются они в зооспорангии в результате деления его содержимого на отдельные участки и выходят через одну или несколько выводковых трубок. У некоторых представителей протоплазматическое содержимое зооспорангия в виде лишенной оболочки массы выходит наружу, где и происходит образование зооспор.

1.2.2.3. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Половой процесс у большинства гиfoxитриомицетов неизвестен. У некоторых представителей наблюдается слияние подвижных изогамет, продукт которого превращается в покоящуюся спору. Покоящиеся споры, окруженные толстыми оболочками и обычно имеющие зернистое содержимое, характерны для многих гиfoxитриомицетов, в том числе и для тех, у которых половой процесс не установлен. Характерным признаком гиfoxитриомицетов является наличие в их оболочках хитина и целлюлозы.

1.2.3. КЛАСС OOMYCETES

1.2.3.1. ЭЛЕМЕНТЫ МОРФОЛОГИИ ТАЛЛОМА, БЕСПОЛОЕ И ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Представители класса оомицетов имеют хорошо развитый неклеточный мицелий [538]. Некоторые виды, вегетативное тело которых представлено голым плазмодием, напоминают талломом хитридиальные грибы (порядок Lagenidiales; порядок Saprolegniales, семейства Ectogellaceae и Thraustochytriaceae).

Особенность таллома представителей этого класса — хорошо выраженная целлюлозная реакция их клеточной оболочки с хлоридом цинка, что свидетельствует о наличии целлюлозы.

Бесполое размножение у большинства оомицетов осуществляется двужгутиковыми зооспорами, жгутики которых различаются не толь-

ко по длине, но и по строению: направленный вперед жгутик — перистый, направленный назад — бичевидный [511]. У ряда высших представителей класса (порядок *Peronosporales*), которые приспособились к наземному образу жизни, где большинство из них развиваются как паразиты цветковых растений, бесполое размножение происходит с помощью экзогенных спор — конидий [339, 437].

Половой процесс — *оогамия* заключается в том, что яйцеклетка оплодотворяется антеридием, содержимое которого не дифференциро-

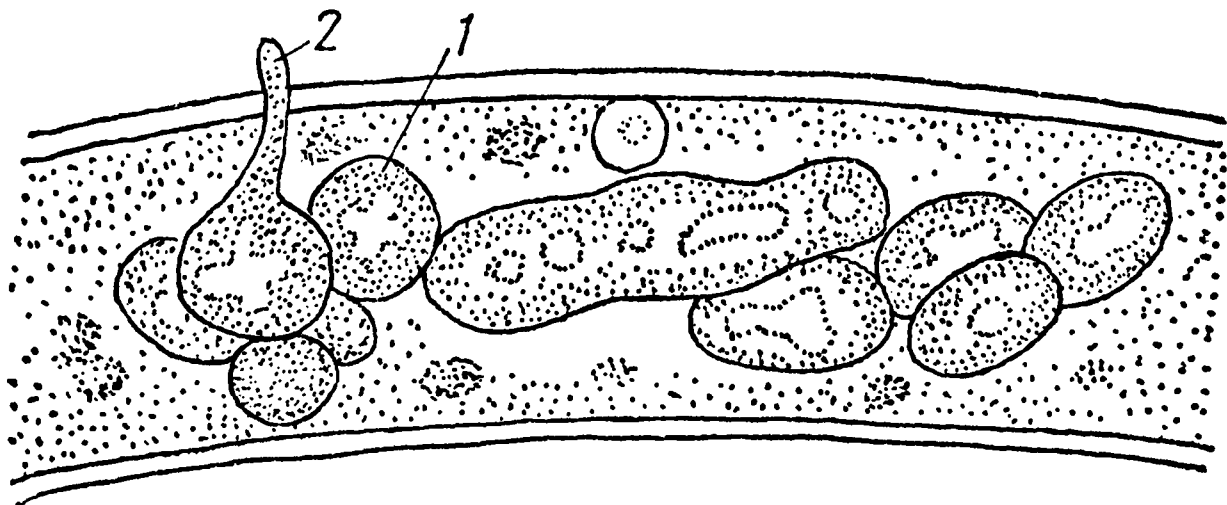


Рис. 6. Эндобиотические талломы (1) и образовавшийся из одного из них зооспорангий (2) лагенидиального гриба *Sirolpidium bryopsidis* (de Bruyne) Н. Е. Petersen в клетке водоросли *Bryopsis*.

вано на гаметы. Процесс оплодотворения происходит таким образом, что часть цитоплазмы антеридия через образующийся на нем оплодотворяющий отросток переливается в яйцеклетку.

По биологии и экологии оомицеты являются одним из наиболее гетерогенных классов. В пределах класса прослеживаются различные стадии перехода от водного существования к наземному, от облигатного сапрофитизма к облигатному паразитизму.

Все это обуславливает значительную специфику морфологии и циклов развития (в частности, размножения) особенно представителей порядков *Lagenidiales*, *Saprolegniales*, *Leptomitales* и *Peronosporales*, характеристика которых приведена ниже лишь в самых общих чертах.

Порядок *Lagenidiales*. Этот порядок объединяет примитивных представителей класса оомицетов, у которых вегетативное тело имеет весьма сходное с низшими хитридиальными грибами строение. Вегетативное тело развивается из зооспоры, которая после периода движения оседает на субстрате и образует ростковую трубку, по которой ее содержимое переливается внутрь клетки организма-хозяина (рис. 6). В дальнейшем это содержимое приобретает сферическую, эллипсовидную, иногда трубчатую, разделенную перетяжками на цепочку округлых или цилиндрических сегментов, или лопастевидную, заключенную в плотную оболочку форму [583, 783]. Зооспоры формируются из протоплазматического содержимого либо внутри зооспорангия, либо в специальном пузыре, который образуется на вершуске выводковой трубки.

Бесполое размножение осуществляется зооспорами, которые имеют весьма разнообразную форму, характерную для представителей различных семейств порядка: яйцевидную с суженным передним концом и отходящими от него жгутиками или форму виноградного семени со жгутиками, отходящими сбоку (семейство *Olpidiopsidaceae*), узко-грушевидную, слегка изогнутую, с передними жгутиками (семейство

Sirolpidiaceae); бобовидную, почковидную, с двумя боковыми жгутиками (семейство *Lagenidiaceae*).

У подавляющего большинства представителей талломы голокарпические, т. е. полностью превращаются в эндобиотические зооспорангии. Формирующиеся в них зооспоры выходят через длинные выводковые трубки.

Половой процесс — гологамия (слияние двух вегетативных тел).

Порядок *Saprolegniales*. Различные по уровню организации организмы с чрезвычайно разнообразным типом строения вегетативного

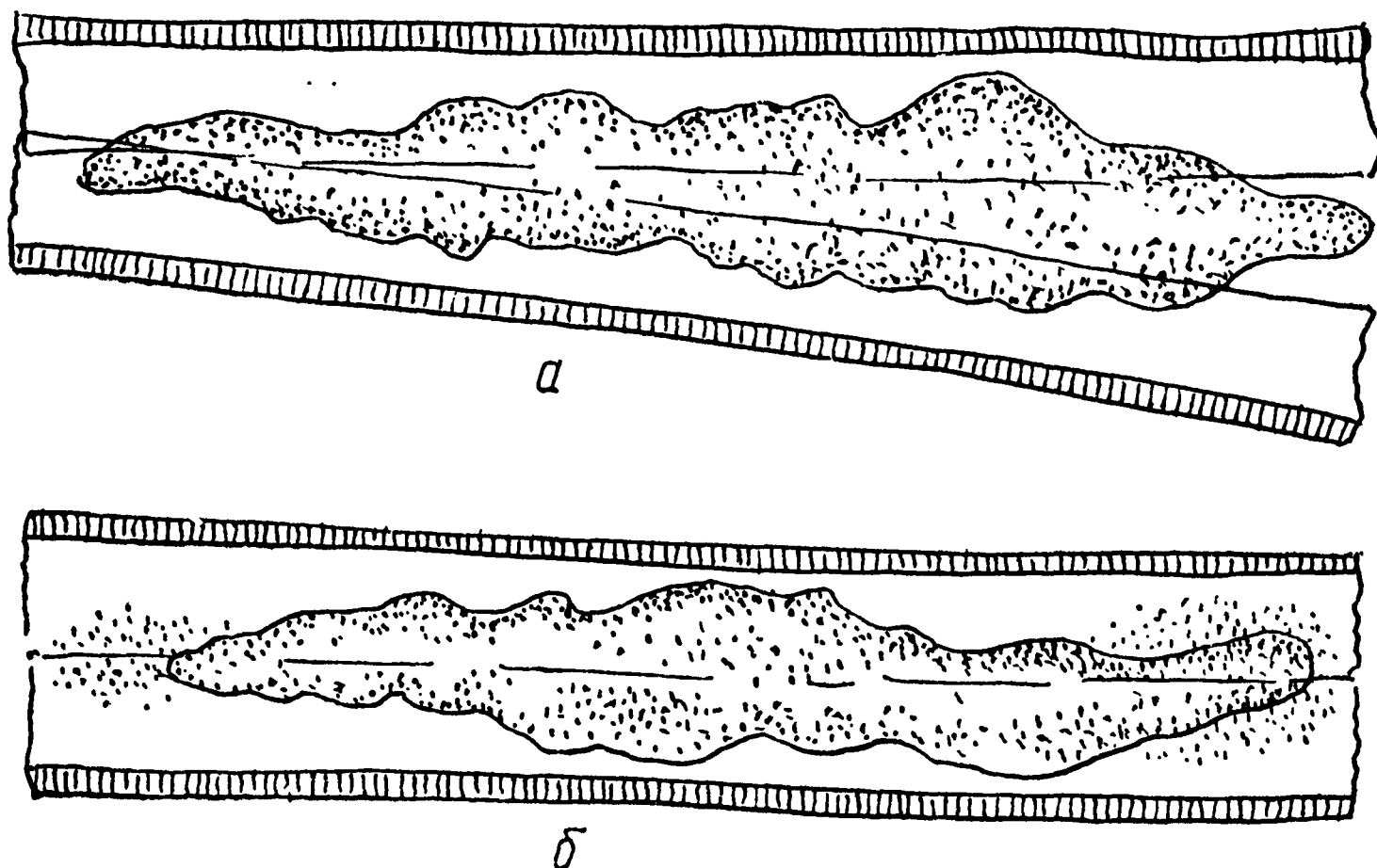


Рис. 7. Эндобиотические талломы эктрогеллового гриба *Ectrogella thapostoma* Scherffel в клетках водоросли *Synedra*:

а — створки водоросли открыты; б — створки водоросли закрыты.

тела. У некоторых (семейство *Ectrogellaceae*) таллом эндобиотический (рис. 7) и лишь в зрелом возрасте частично эпибиотический (часть его расположена экстраматрикулярно по отношению к субстрату), голокарпический, мешковидный. У других (семейство *Thraustochytriaceae*) — таллом эпи- и эндобиотический, эукарпический, состоящий из приподнятого над субстратом остатка спорангия и погруженной в субстрат системы ризоидов. У тех и других строение вегетативного тела напоминает таковое хитридиомицетов (порядок *Chytridiales*) и характеризуется ограниченным ростом. У видов семейства *Saprolegniaceae* вегетативное тело состоит из хорошо развитых и обильно разветвленных ценоцитных гиф (рис. 8), которые способны к неограниченному росту и часто образуют на субстрате скопления в виде пустиул или войлочной подстилки [538, 635].

Поперечные перегородки в талломе сапролегниальных образуются только для ограничения репродуктивных органов и гемм (хламидоспор), которые представляют собой вздутые части гиф различной формы, часто собранные в цепочки.

Бесполое размножение осуществляется двужгутиковыми зооспорами. У некоторых видов существуют две стадии зооспор, т. е. наблюдается явление дипланетизма, сопровождающееся диморфизмом, когда споры обеих стадий имеют различный внешний вид (семейства

Ectrogellaceae, Saprolegniaceae). Первичные зооспоры обычно имеют грушевидную форму и два жгутика на переднем конце. После полчасового периода движения они инцистируются, и через некоторое время из них выходят вторичные почковидные зооспоры с двумя боковыми жгутиками. У первичных зооспор оба жгутика почти одинаковой длины: направленный вперед жгутик — перистый, направленный назад — бичевидный. Жгутики вторичных зооспор имеют такое же строение, но передний жгутик немного короче заднего.

Половой процесс — оогамия (совершается с помощью специальных половых органов — оогониев и антеридиев) (рис. 8). В оогонии формируется одна или несколько яйцеклеток (ооспор). Сначала яйцеклетки многоядерные, в зрелом же состоянии каждая из них содержит одно ядро. Антеридии в отличие от оогониев не дифференцированы на гаметы и обычно представляют собой цилиндрические нитевидные прямые или изогнутые выросты гиф мицелия.

В том случае, когда оогонии и антеридии формируются на разных талломах, вид рассматривается как *гетероталлический*, если же оогонии и антеридии развиваются на одном талломе — *гомоталлический*.

Антеридий примыкает к оболочке оогония и через поры в ней прорастает внутрь оогония одним или несколькими оплодотворяющими отростками, через которые в яйцеклетку переходит часть его содержимого с одним ядром. Зрелая ооспора покрывается толстой оболочкой. Содержимое ооспоры имеет вид тонкозернистой протоплазмы с многочисленными мелкими вклю-

чениями капель масла, расположение которых имеет систематическое значение. Капли масла всегда сосредоточены на периферии ооспор, но у одних видов равномерно размещаются вдоль оболочки ооспоры, окружая центральную протоплазму, а у других сливаются в одну или две большие капли, расположенные возле оболочки. Первый тип ооспор называется *центрическим*, второй — *эксцентрическим*. Кроме того, существует третий, так называемый *субцентрический*, тип ооспор, у которых протоплазма окружена с одной стороны одним слоем капель, а с другой — двумя-тремя. После периода покоя ооспоры прорастают ростковой трубкой, которая удлиняется, разветвляется и превращается в новый таллом. Иногда на конце ростковой трубки образуется зооспорангий. Таллом у сапролегниальных гаплоидный, диплоидной является только ооспора.

Порядок Leptomitales. У наиболее просто организованных представителей вегетативное тело не имеет спе-

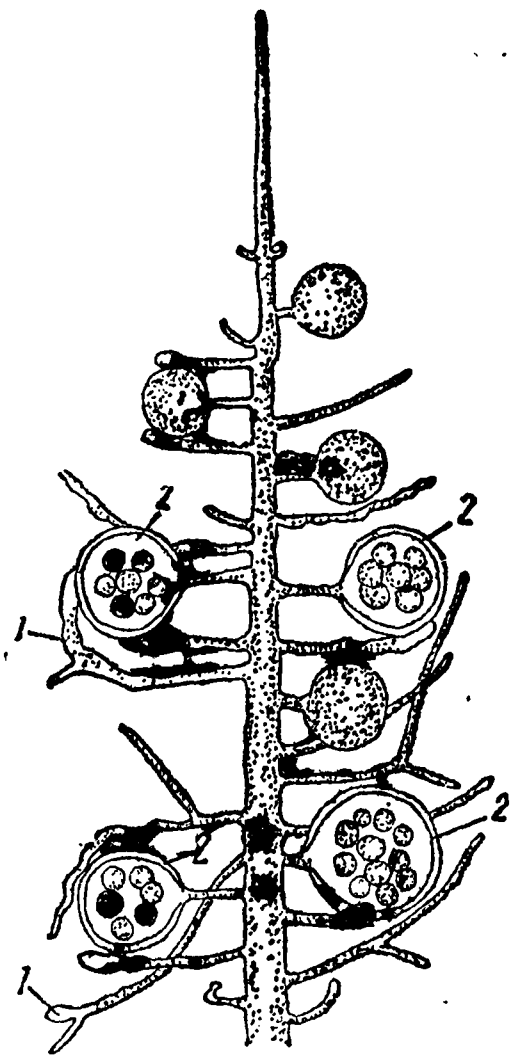


Рис. 8. Разветвленный мицелий сапролегниевых гриба *Achlya debaryana* Humphrey:

1 — антеридии; 2 — оогонии.

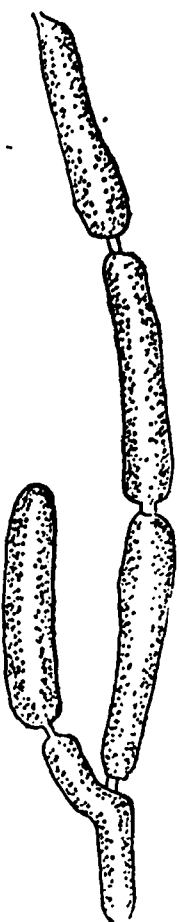


Рис. 9. Разветвленный мицелий лептомитового гриба *Leptomitum lacteus* (Roth) Agardh. с перетяжками.

циализированной системы ризоидов и даже базальной клетки и состоит из хорошо развитых гиф, обладающих неограниченной способностью к росту в длину и ветвлению (рис. 9), с многочисленными перетяжками, содержащими пробочки из целлюлина (семейство *Leptomitaceae*). У других представителей таллом древовидный, в большей или меньшей степени дифференцированный на базальную часть и вер-

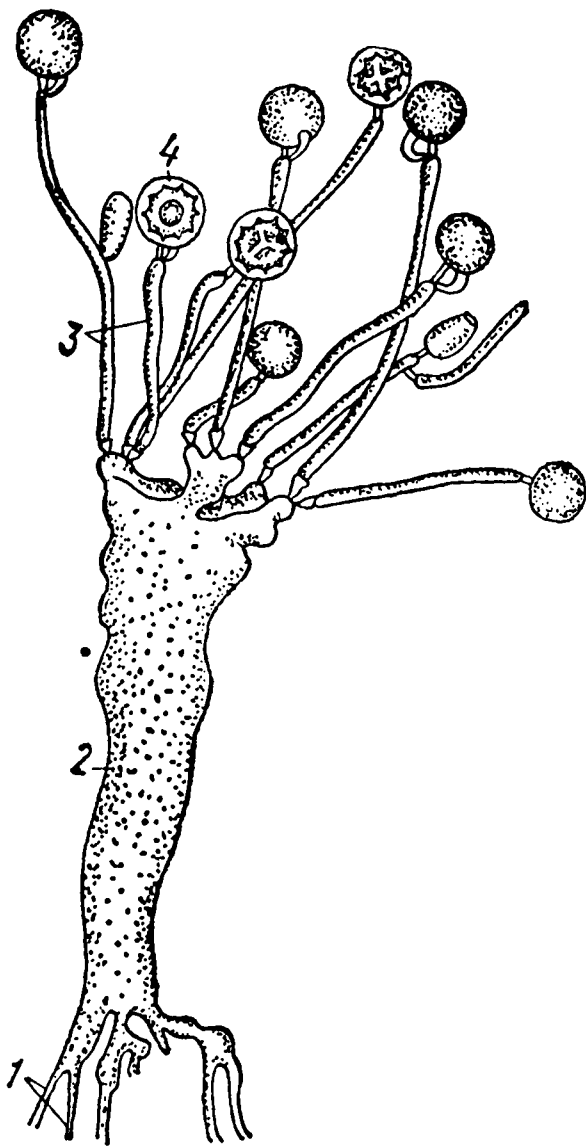


Рис. 10. Таллом рипидиевого гриба *Rhipidium americanum* Thaxter:

1 — ризоиды; 2 — базальная (стволовидная) часть; 3 — гифальные ответвления; 4 — ооспоры.

хушечные гифальные ответвления (семейство *Rhipidiaceae*) (рис. 10). В последних также обнаружены перетяжки с псевдосептами и пробочками из целлюлина [538, 783, 829].

Бесполое размножение осуществляется двужгутиковыми зооспорами. Первичные и вторичные зооспоры лептоминовых грибов по форме и строению жгутиков идентичны первичным и вторичным зооспорам сапролегниевых грибов.

Половой процесс — оогамия, причем в оогонии большинства представителей порядка формируется только одна яйцеклетка. У более совершенных представителей порядка (семейство *Rhipidiaceae*) отмечена дифференциация содержимого оогония на периплазму и ооплазму. Процесс оплодотворения в общих чертах происходит так же, как у сапролегниальных грибов, — часть содержимого антеридия через специальный оплодотворяющий отросток переливается в яйцеклетку, которая покрывается гладкой или звездчатой оболочкой и превращается в ооспору, свободно лежащую в полости оогония.

Порядок Peronosporales. Вегетативное тело представлено хорошо развитым ценоцитным, бесцветным, многоядерным мицелием, состоящим из нитевидных, более или менее разветвленных гиф. Перегородки появляются в основ-

ном в стареющем мицелии и служат для отделения отмерших частей. У большинства представителей мицелий эндофитный, т. е. находится в тканях растения-хозяина, у немногих известен воздушный мицелий (семейство *Pythiaceae*). На эндофитном мицелии, проходящем по межклетникам, образуются специальные нитевидные, шаровидные, лапчатые присоски — *гаустории*, с помощью которых гриб внедряется в клетку [339, 437].

Бесполое размножение осуществляется зооспорами, которые развиваются в специальных спорангиях, и через выводковую трубку выходят наружу (семейство *Pythiaceae*), зооспорангиями, которые при отсутствии капельно-жидкой воды могут функционировать как конидии, т. е. прорасти не зооспорами, а ростковой гифой (семейство *Phytophthoraceae*), и, наконец, конидиями, в которые необратимо превратились зооспорангии многих видов семейства *Peronosporaceae*.

В систематике некоторых представителей порядка *Peronosporales*

существенное значение имеет строение спороносцев — гиф, несущих зооспорангии или конидии. У примитивных представителей (рис. 11, а) они недифференцированы и практически ничем не отличаются от вегетативных гиф (семейство Pythiaceae). По мере перехода от водного к наземному образу жизни наблюдается усложнение строения спороносцев (рис. 11, б): у некоторых представителей порядка они слабо

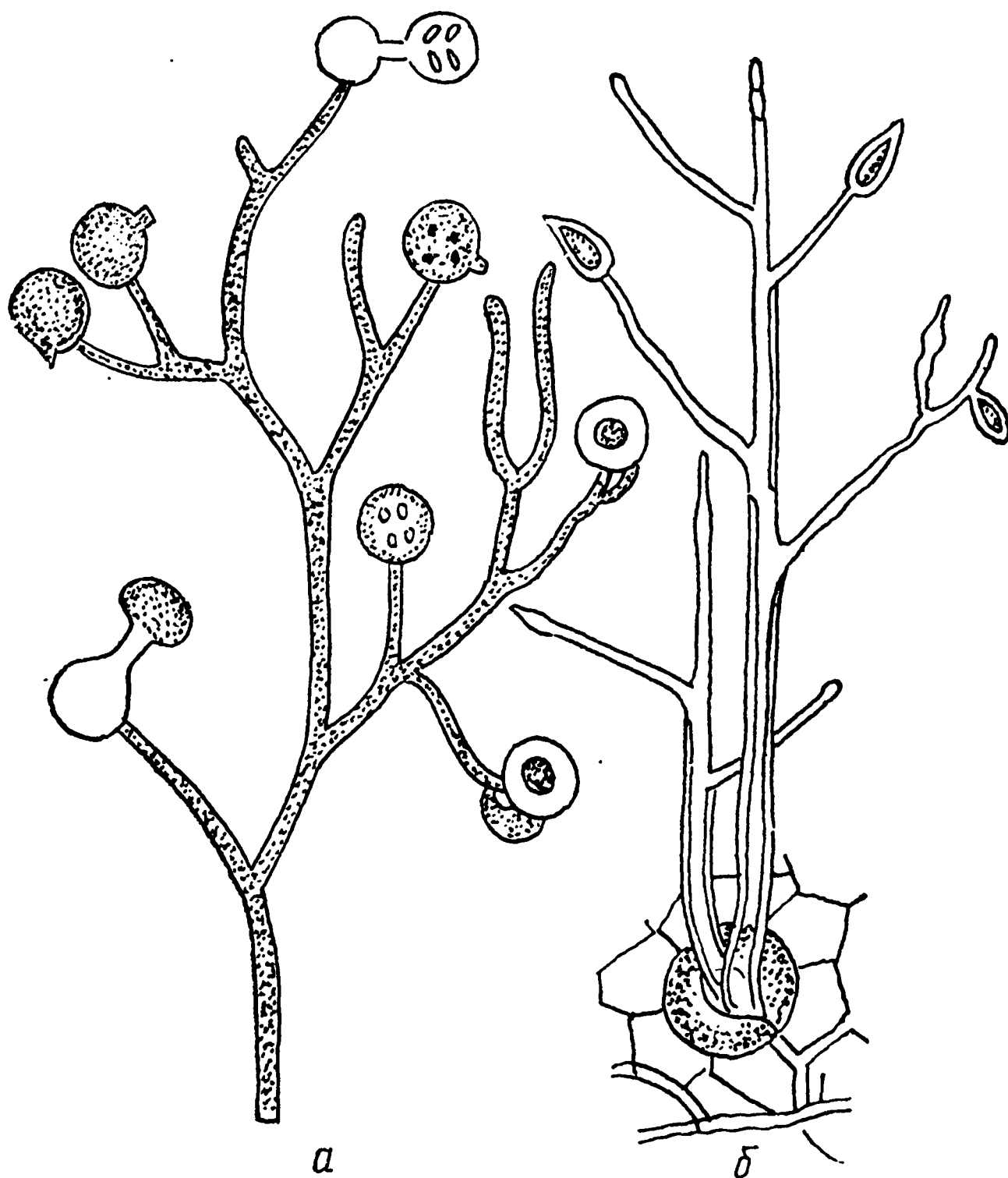


Рис. 11. Типы ветвления вегетативных гиф и спороносцев у некоторых представителей порядка Peronosporales:

а — мицелий *Pythium debaryanum* Hesse с оогониями и прорастающими зооспорангиями; б — спорангиеносцы *Phytophthora infestans* de Bary со спорангиями.

разветвлены симподиально (семейство Phytophthoraceae), у других ветвление достигает значительного развития (семейство Peronosporaceae) и является важным систематическим признаком. Так, род *Sclerospora* имеет короткие толстые спороносцы, на верхушках которых образуется несколько беспорядочно расположенных дихотомических ответвлений. Для рода *Plasmopara* характерно многократное моноподиальное ветвление спороносцев, ветви которых расположены обычно под прямым углом. Дихотомически разветвленные спороносцы, но с ответвлениями, расположенными под острым углом, наблюдаются у видов рода *Bremia*. Конечные ответвления имеют воронковидные

или дланевидные расширения, от которых отходят заостренные на верхушке стеригмы. Виды родов *Peronospora* и *Peronoplasmopara* также имеют многократно дихотомически разветвленные спороносцы, но в отличие от видов рода *Bremia* они лишены дланевидных расширений на концах ответвлений [583].

Спороносцы либо выходят на поверхность субстрата (тканей растения-хозяина) одиночно или пучками (семейство *Peronosporaceae*), либо формируются под эпидермисом (семейство *Albuginaceae*). На их конечных ответвлениях образуются споры (зооспорангии, конидии) — одноклеточные, округлые, эллипсоидальные, яйцевидные, лимоновидные. Споры могут прорасти двужгутиковыми зооспорами (семейство *Peronosporaceae*, роды *Sclerospora*, *Basidiophora*, *Peronoplasmopara*, частично *Plasmopara*, семейство *Albuginaceae*) или ростковой трубкой, как настоящая конидия (семейство *Peronosporaceae*, роды *Bremia* и *Peronospora*).

Половой процесс — оогамия. Органами полового размножения являются оогонии и антеридии. В оогонии всегда имеется только одна яйцеклетка (ооспора), окруженная периплазмой. Оогонии и антеридии закладываются на воздушном и межклеточном мицелии (семейство *Rythiaceae*) или только на эндофитном мицелии (семейства *Peronosporaceae* и *Albuginaceae*). Антеридии одноклеточные, цилиндрические или булабовидные. В зависимости от места расположения различаются следующие типы антеридиев: *моноклинные* — развивающиеся на той же гифе, что и оогоний; *диклинные* — развивающиеся на разных гифах с оогонием; *гипогинные* — расположенные под оогонием либо развивающиеся внутри его ножки или на ее верхушке; *амфигинные* — оплетающие ножку оогония, часто вследствие того, что зачаток оогония прорастает через зачаток антеридия; *парагинные* — примыкающие к оогонию сбоку, не соприкасаясь с его ножкой. Оогонии образуются на гифах терминально, иногда интеркалярно.

Оплодотворенная яйцеклетка превращается в ооспору, которая покрывается утолщенной оболочкой, состоящей из более тонкого светлоокрашенного внутреннего слоя — *эндоспория* и толстого, гладкого или скульптурированного наружного слоя — *экзоспория*, окрашенного в коричнево-бурый цвет. Ооспора полностью заполняет оогоний (*плеротическая*) или свободно лежит в его полости (*аплеротическая*). У ряда представителей ооспоры образуются в небольшом количестве или вообще отсутствуют.

Обычно ооспоры прорастают после длительного периода покоя, хотя известны случаи их немедленного прорастания. Из прорастающей ооспоры у ряда видов непосредственно образуется зооспорангий, продуцирующий зооспоры. У некоторых наиболее высокоорганизованных представителей порядка при прорастании ооспоры сразу же образуется мицелий. Прорастание ооспоры сопровождается редуционным делением диплоидного копуляционного ядра.

1.2.4. КЛАСС ZYGOMYCETES

1.2.4.1. ЭЛЕМЕНТЫ МОРФОЛОГИИ ТАЛЛОМА

Вегетативное тело обычно представлено хорошо развитым ценотическим мицелием без перегородок. В зрелом мицелии иногда появляются перегородки, которые расчленяют его на отдельные клетки (порядки *Mucorales* и *Entomophthorales*).

1.2.4.2. БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Бесполое размножение осуществляется с помощью спорангиоспор (эндогенных неподвижных спор, образующихся в спорангиях) или конидий. Спорангиоспоры характерны для мукоральных, а конидии — для энтомофторальных грибов [145, 216, 304].

Спорангии зигомицетов могут иметь разнообразную форму и размеры, но преимущественно бывают шаровидными, овальными или грушевидными. Они отделены от несущей гифы (*спорангиеносца*) перегородкой. У многих видов перегородка в виде арки вдается в полость спорангия и образует так называемую колонку (рис. 12). Спорангио-

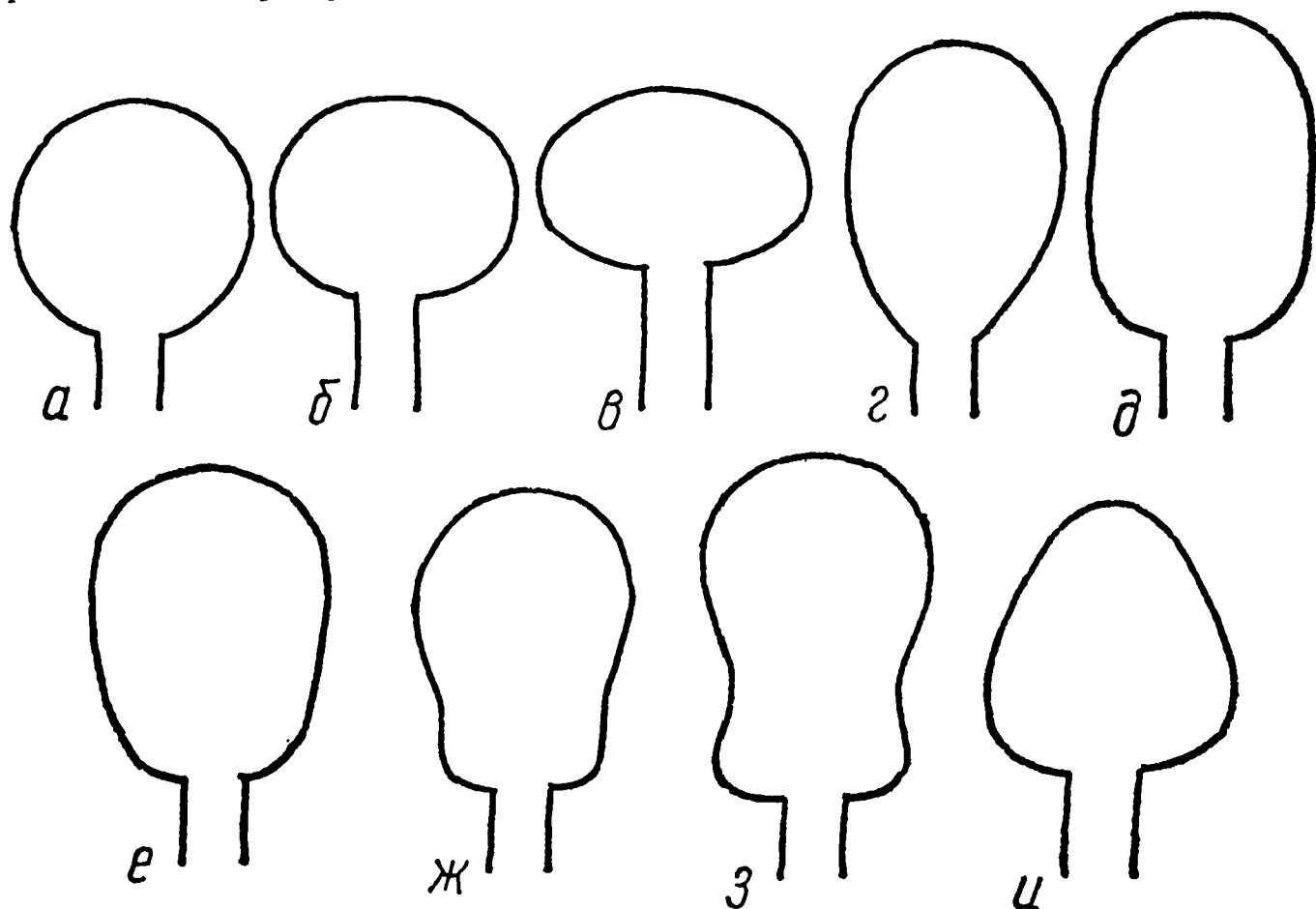


Рис. 12. Колонки мукоральных грибов:

а — шаровидная; *б* — шаровидная, плоская у основания; *в* — приплюснuto-шаровидная; *г* — эллиптически-шаровидная (овальная); *д* — цилиндрическая; *е* — яйцевидная; *ж* — обратногрушевидная; *з* — гитаровидная; *и* — коническая.

споры образуются в результате деления протоплазмы спорангия на одноядерные участки, которые покрываются оболочкой и выходят через разрыв стенки спорангия (порядок Mucorales). Известны случаи, когда спорангий с силой отбрасывается от спорангиеносца в результате тургорного давления, возникающего в спорангиеносце, и только потом из него выходят спорангиоспоры. Спорангиоспоры прорастают ростковой гифой, которая развивается в новый мицелий.

На примере зигомицетов порядка Mucorales можно проследить постепенные переходы от спорангиального к конидиальному спороношению (у высших форм мукоральных эндогенные споры отсутствуют). Превращение это идет различными путями. Так, у некоторых мукоральных (виды рода *Thamnidium*) образуются *спорангиолы* — структуры, промежуточные между спорангиями и конидиями. *Стилоспорангии* (спорангии с колонкой) при этом образуются на верхушке главной оси спорангиеносца, а *спорангиолы* (мелкие спорангии без колонки с количеством спор менее 10 — на боковых ответвлениях главной оси. При неблагоприятных условиях число спор в спорангиолах уменьшается до одной и, хотя спора не срывается в данном случае с обо-

лочкой маленького спорангия, эта структура функционирует как конидия. У некоторых зигомицетов порядка Mucorales этот процесс продвинулся дальше (виды рода *Chaetocladium*): здесь образуются спорангиолы, у которых оболочка спорангиоспоры срастается с оболочкой спорангиолы, т. е. возникает настоящая конидия. Аналогичный процесс отмечен у других мукоральных грибов (виды родов *Syncephalastrium*, *Syncephalis* и *Piptocerphalis*) с *мероспорангиями* — цилиндрическими спорангиями, которые расчленяются поперечными перегородками на цепочку спор [304].

У ряда представителей мукоральных грибов вообще не известно бесполое размножение с помощью спорангиоспор, оно полностью заменено конидиальным (порядок Mucorales, семейства Cunninghamellaceae, Kickxellaceae и Dimargaritaceae).

У энтомофторальных грибов (порядок Entomophthorales) бесполое размножение происходит исключительно с помощью конидий, которые образуются на неспециализированных гифах [145, 216].

1.2.4.3. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Половой процесс — зигогамия (разновидность гологамии — слияние двух клеток, содержимое которых не дифференцировано на гаметы).

Копулирующие отростки зигомицетов обычно имеют вид коротких боковых ответвлений вегетативных гиф, реже спорангиеносцев (рис. 13). Морфологически они идентичны вегетативным гифам либо отличаются от них колбовидной или грушевидной формой. Копулирующие отростки в большинстве случаев одинакового размера (*изогамные*), реже один больше другого (*гетерогамные*). Большей частью они много-

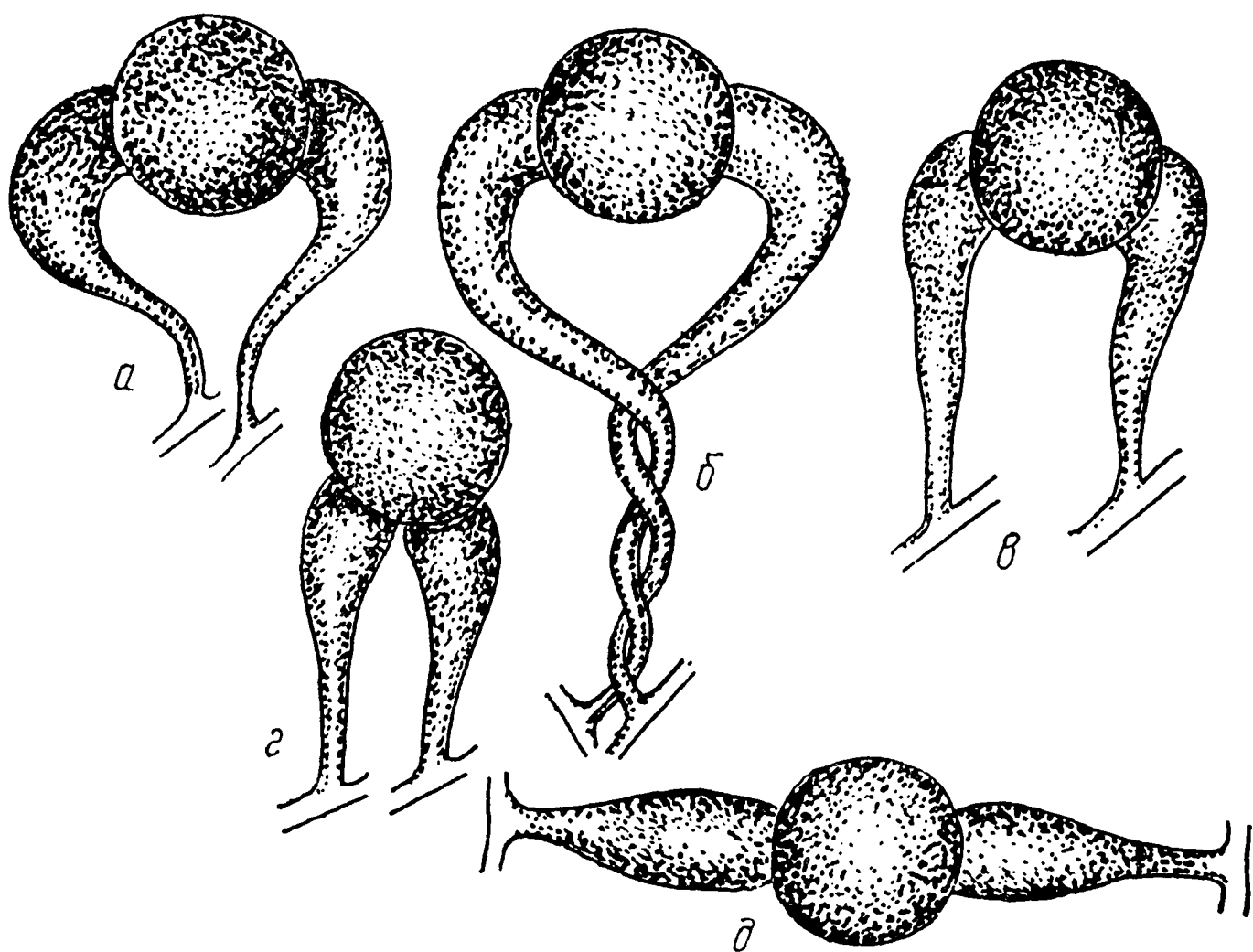


Рис. 13. Копулирующие отростки мукоральных грибов различной формы с зигоспорой:

а — клещевидно изогнутый; *б* — клещевидно изогнутый вверху и спирально закрученный внизу; *в*, *г* — параллельнолежащий; *д* — противолежащий.

ядерные, хотя иногда имеют одно ядро. При слиянии копулирующих отростков от них отделяются перегородкой многоядерные клетки — голоциты; их содержимое сливается и образуется зигоспора. Зигоспоры покрываются утолщенной скульптурированной коричневой или темно-коричневой оболочкой. Различают несколько типов слияния ядер в зигоспорах: 1) слияние ядер и редукционное деление диплоидных ядер происходит до периода покоя; 2) слияние ядер и редукционное деление происходит после периода покоя при прорастании зигоспоры; 3) ядра не сливаются, зигоспора развивается партеногетически. Зигоспоры прорастают ростковой трубкой, на конце которой образуется спорангий или группа спорангиол [304].

Для многих энтомофторальных, у которых в связи с паразитическим образом жизни мицелий редуцируется и распадается на гифенные тела, при половом процессе зигогамного типа характерна попарная копуляция гифенных телец. При этом зигоспора образуется в специальном боковом выросте прокопулировавших клеток.

Для эндогональных характерна гетерогамия копулирующих клеток: содержимое меньшей (мужской) клетки переходит в большую (женскую). Зигота, как и у энтомофторальных, образуется в специальном выросте, который развивается на женской клетке. Еще одной особенностью зигомицетов порядка *Endogonales* является образование вокруг зиготы плотного сплетения вегетативных гиф, напоминающих плодовое тело гриба [583].

1.2.5. КЛАСС TRICHOMYCETES

1.2.5.1. ЭЛЕМЕНТЫ МОРФОЛОГИИ ТАЛЛОМА

Положение этого класса в системе окончательно не определено [675]. Вегетативное тело одноклеточное, ценоцитное, с перегородками, отделяющими репродуктивные органы, или же многоклеточное, разветвленное, с перегородками (имеется указание на то, что перегородки не сплошные, а перфорированные). Прикрепляется к субстрату (организму хозяина) с помощью специальной присоски.

1.2.5.2. БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Бесполое размножение осуществляется экзогенными спорами — трихоспорами с волосковидными придатками и придатками в виде воротничка (порядок *Harpellales*) и артроспорами без придатков (порядок *Asellariales*). Трихоспоры и артроспоры могут быть ладьевидными, серповидными, удлинено-овальными, прямыми или спирально изогнутыми [691].

Известно также бесполое размножение с помощью эндоспор — спорангиоспор (порядок *Escriniales*) и подвижных амeboидных клеток (порядок *Amoebidiales*).

1.2.5.3. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Половой процесс обнаружен не у всех представителей; в тех случаях, когда он известен, — это типичная зигогамия: слияние двух обособившихся в нити протопластов или двух ядер в сегменте нити. Более совершенная форма зигогамии — слияние соседних клеток гифы или противоположащих клеток двух параллельных гиф. Зигота (зигоспора), образуемая в результате полового процесса, покрыта толстой оболочкой и имеет биконическую форму (порядок *Harpellales*).

1.3. ВЫСШИЕ ГРИБЫ

1.3.1. КЛАСС ASCOMYCETES

Вегетативное тело представлено многоклеточным многоядерным или одноядерным мицелием, имеющим настоящие перегородки. У некоторых низших аскомицетов (дрожжи) вегетативное тело в виде отдельных почкующихся или делящихся клеток.

1.3.1.1. ЭЛЕМЕНТЫ МОРФОЛОГИИ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ

Мицелий сумчатых грибов имеет специальныеместилища — плодовые тела, в которых происходит развитие сумок (асков), содержащих аскоспоры, образующиеся в результате полового процесса. У аскомице-

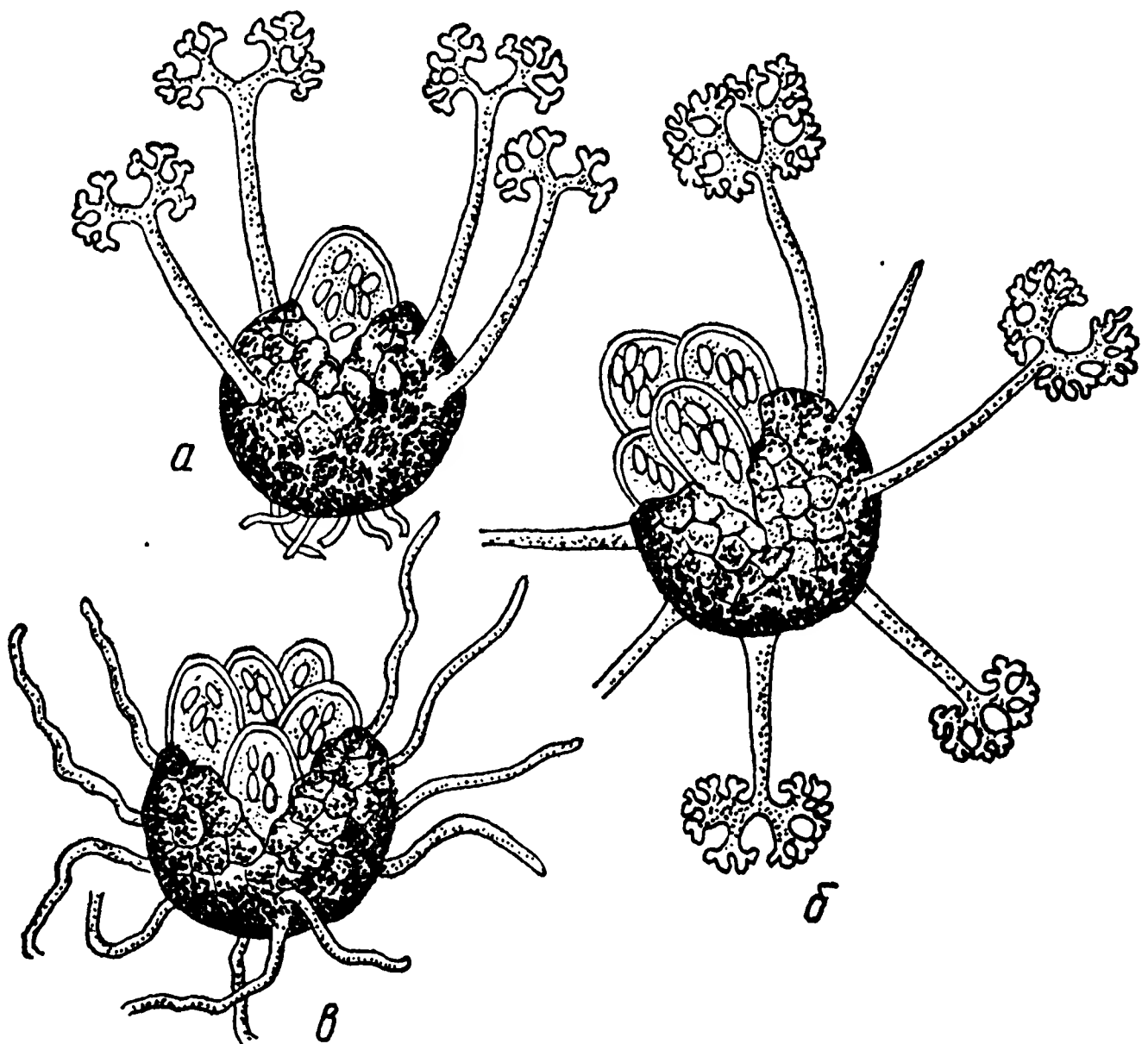


Рис. 14. Клейстотеции сумчатых грибов с выходящими из них сумками с аскоспорами:

a — *Podosphaera oxyacanthae* de Bary; *б* — *Microsphaera alphitoides* Griffon et Maubl.; *в* — *Erysiphe communis* Grev.

тов отмечены следующие типы плодовых тел: *клеистотеции* — замкнутые плодовые тела, содержащие сумки округлой формы, которые обычно расположены в полости клеистотеция без определенного порядка и без парафиз между ними (рис. 14), *перитеции* — полузамкнутые плодовые тела шаровидной или грушевидной формы с отверстием на вершине, содержащие эллиптические или булабовидные сумки, которые обычно собраны в пучок, часто с парафизами (рис. 15); *апотеции* — открытые плодовые тела бокаловидной или чашевидной формы, на

верхней поверхности которых находится *гимений* — слой цилиндрических или булавовидных сумок и парафиз (рис. 16). Кроме того, у ряда сумчатых грибов (асколокулярных) известны аскостромы, по внешнему виду напоминающие перитеции, но отличающиеся от них отсутствием собственной оболочки (перидия).

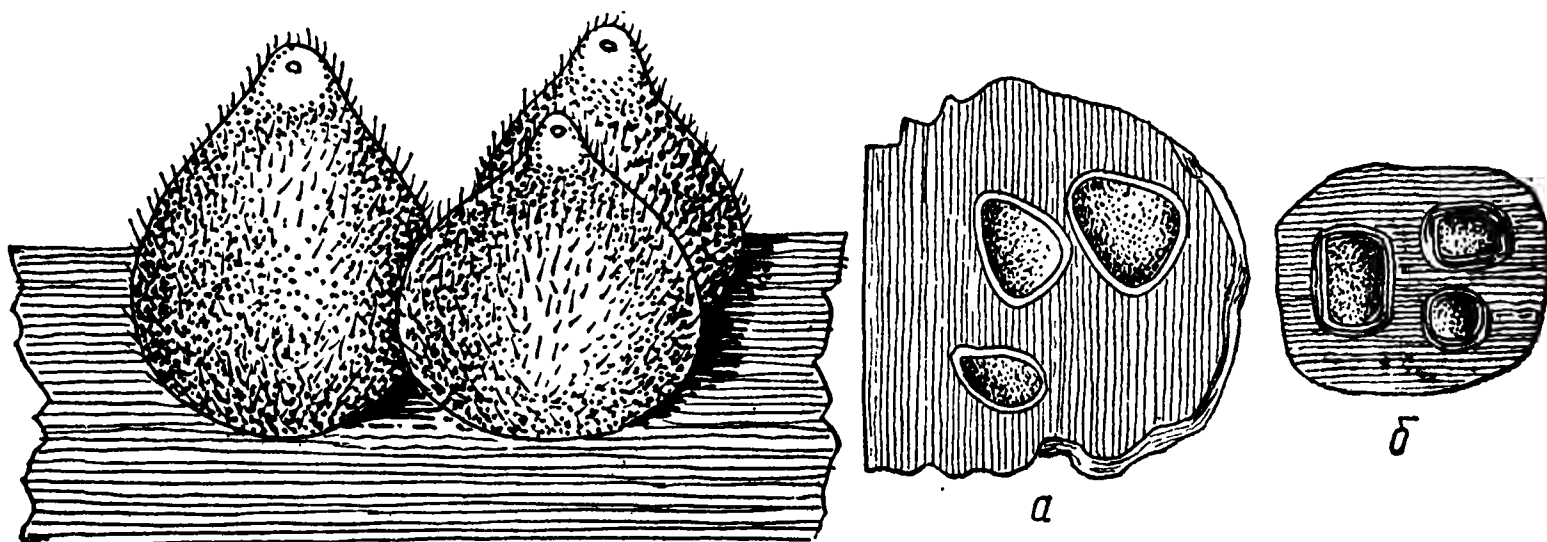


Рис. 15. Перитеции сумчатого гриба *Trichosphaeria* sp.

Рис. 16. Апотеции сумчатых грибов:

a — *Tapesia fusca* (Pers.) Rehm; *б* — *Niptera* sp.

Плодовые тела сумчатых грибов могут быть одиночными, расположенными на мицелии или сгруппированными и погруженными в специальное сплетение вегетативных гиф — строуму. Особенно это характерно для аскомицетов, имеющих плодовые тела типа перитециев. При этом перитеции в строуме в отличие от локул аскостромы всегда имеют собственный перидий [162].

1.3.1.2. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Сумка (аск), являющаяся у сумчатых грибов продуктом полового процесса, у высокоорганизованных аскомицетов образуется на аскогенных гифах, которые развиваются из зиготы.

После образования сумки в ней происходит слияние ядер зиготы и последующее редукционное деление ядра. Таким образом, формирующиеся в сумке аскоспоры являются гаплоидными. Обычно в сумке бывает по восемь аскоспор, но известны случаи, когда число их сокращается до двух или в значительной степени увеличивается. Форма аскоспор и количество клеток их составляющих весьма различны у представителей разных родов [51].

Выход аскоспор из сумок происходит несколькими способами в зависимости от строения сумки. *Прототуникатные* сумки с тонкой однослойной оболочкой освобождают аскоспоры пассивно в результате разрушения оболочки. Освобождение аскоспор из *эутуникатных* сумок часто происходит с помощью особых структур, обеспечивающих раскрытие сумок на вершукке. Такие структуры чаще всего имеются в *унитуникатных* сумках с более тонкой, нередко однослойной оболочкой. В *битуникатных* сумках, имеющих двухслойную оболочку, активное выбрасывание аскоспор происходит в результате разрушения наружного слоя под влиянием тургора, растягивающего внутренний слой.

У низших аскомицетов сливающиеся половые клетки морфологически не отличаются друг от друга; сливаются только два ядра, и зигота без периода покоя превращается в сумку.

Высшие аскомицеты характеризуются более сложным процессом гаметангиогамии. У них сливается содержимое одноклеточного антеридия и аскогона — женского полового органа, снабженного трихогией. По трихогине цитоплазма антеридия поступает в аскогон, где ядра группируются попарно и образуют дикарионы. Дикарионы переходят в аскогенные гифы, вырастающие из аскогона, и здесь происходит синхронное деление их ядер. В аскогенных гифах появляются перегородки, вычленяющие двуядерные клетки. На следующей стадии на концах аскогенных гиф формируются сумки. Верхушечная клетка аскогенной гифы начинает расти крючковидно изогнуто, ядра дикариона располагаются в месте изгиба и попарно делятся. Два ядра разного знака остаются на месте деления, два других меняют свое положение: одно переходит в основание крючка, другое — в кончик. Поперечными перегородками при основании крючка и на его конце выделяются одноядерные клетки, которые затем сливаются и вновь превращаются в двуядерную клетку. Сумка же развивается из средней клетки крючка. В ней происходит слияние ядер дикариона, а затем редукционное деление диплоидного ядра. В результате последующих митотических делений образуется восемь или больше гаплоидных ядер, вокруг которых за счет эпиплазмы формируются аскоспоры [162].

У некоторых представителей сумчатых грибов отмечена редукция антеридиев. У этих видов оплодотворение аскогона осуществляется с помощью сперматозоидов — мелких неподвижных клеток, которые переносятся на аскогон каплями дождя, потоками воздуха и на лапках насекомых. Иногда функцию антеридия выполняют неспециализированные вегетативные гифы мицелия, конидии и т. д.

1.3.1.3. БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Бесполое размножение сумчатых грибов обеспечивается специальными экзогенными спорами — конидиями, которые обычно развиваются на специальных выростах гаплоидного мицелия — конидиеносцах, а иногда непосредственно на мицелии. Редко наблюдается эндогенное образование конидий (класс *Deuteromycetes*).

1.3.2. КЛАСС BASIDIOMYCETES

К этому классу относится около 30 тыс. видов. Характерный признак класса — наличие базидий, на которых экзогенно образуются базидиоспоры. Базидии могут быть одноклеточными (холобазидии) либо разделенными поперечными, продольными или косыми перегородками (фрагмобазидии). Класс *Basidiomycetes* по характеру строения базидий обычно делят на два подкласса: *Holobasidiomycetidae* (виды с одноклеточными базидиями) и *Phragmobasidiomycetidae* (виды с перегородчатыми базидиями). Некоторые авторы выделяют три подкласса [515, 537], разделяя подкласс *Phragmobasidiomycetidae* на два подкласса и рассматривая как самостоятельный подкласс головневые и ржавчинные грибы — *Teliosporae* [515, 537] или же разделяя на два подкласса подкласс *Holobasidiomycetidae* и рассматривая как самостоятельный подкласс агарикальные грибы и гастеромицеты — *Gasteropileati* [72]. Особняком стоят системы, в которых из класса *Basidiomycetes* выделяют гастеромицеты и относят их к подклассу *Gasteromycetidae* [658] или классу — *Gasteromycetes*, деля его на два подкласса — *Exogasteromycetidae* и *Endogasteromycetidae* [734]; последнюю трактовку класса *Basidiomycetes* s. str. мы не принимаем.

Представители разных систематических групп класса Basidiomycetes чрезвычайно разнообразны по типу, форме, размерам, окраске и способам плодоношения.

1.3.2.1. ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА (КАРПОФОРЫ, СПОРОФОРЫ, БАЗИДИОФОРЫ)

Для представителей порядков Exobasidiales, Uredinales, Ustilaginales характерно отсутствие плодовых тел, базидии образуются непосредственно на мицелии, телейтоспорах или хламидоспорах. У высших базидиомицетов плодовые тела имеют сложное строение, они дифференцированы на разные по форме стерильную и плодущую части, более или менее приподнятые над субстратом и имеют шляпку и ножку. Эволюция класса Basidiomycetes шла в направлении образования плодовых тел, защиты гимениального слоя от неблагоприятных условий и обеспечения рассеивания спор. В направлении усложнения плодового тела базидиальные грибы эволюционировали от распростертого гипохноидного, состоящего только из очень тонкого рыхлого сплетения гиф, до агарикоидного со шляпкой, сидящей на более или менее длинной ножке. Основные типы плодовых тел базидиомицетов: кортициоидное, стероидное, фомитоидное, ганодермоидное, гиднеллоидное, тремеллоидное, мукронеллоидное, кортицирамоидное, рамариоидное, клавариоидное, герициоидное, резупинатное, цифеллоидное, плевротоидное, кантареллоидное, агарикоидное, секотиоидное, гастроидное (рис. 17).

1.3.2.2. МОРФОЛОГИЯ ПРИМОРДИЕВ И РАЗВИТИЕ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ

Примордии — зачатки плодовых тел — образуются на мицелии, у микоризообразующих видов нередко прямо на микоризных корешках в виде крошечных клубеньков или желвачков. В природных условиях примордии обнаружить нелегко; обычно их развитие изучают в чистой культуре. Существует несколько классификаций типов развития плодовых тел высших Basidiomycetes [751, 774, 775]. Согласно классификации Р. Зингера [775] в интерпретации Л. Н. Васильевой [89], отмечаются следующие типы развития плодовых тел: а) *гимнокарпный* — гимениальный слой с самого начала и до созревания спор располагается открыто; б) *гемиаңгиокарпный* — гимениальный слой сначала закрыт, а затем до созревания спор остается открытым; в) *псевдоаңгиокарпный* — гимениальный слой сначала открыт, а потом закрывается загнутым краем шляпки; г) *аңгиокарпный* — плодовое тело открывается только после созревания спор. У многих видов высших базидиомицетов имеются покрывала весьма разнообразного строения. Общее покрывало (*velum universale*) покрывает все плодовое тело на начальных стадиях его развития. При разрастании плодового тела общее покрывало разрушается, но в большинстве случаев его остатки образуют хлопья на поверхности шляпки и вольву при основании ножки (например, виды рода *Amanita*). Частное покрывало (*velum parziale*) образовано сросшимися гифами шляпки и ножки, оно покрывает гименофор, иногда ножку, но не покрывает шляпку. Частное покрывало иногда отрывается от края шляпки и сохраняется в виде кольца на ножке или отрывается от ножки и сохраняется на краю шляпки. При отрыве покрывала от края шляпки и ножки образуется подвижное кольцо (родовой признак, например, *Macrolepota*). Характер покрывала является важным таксономическим признаком.

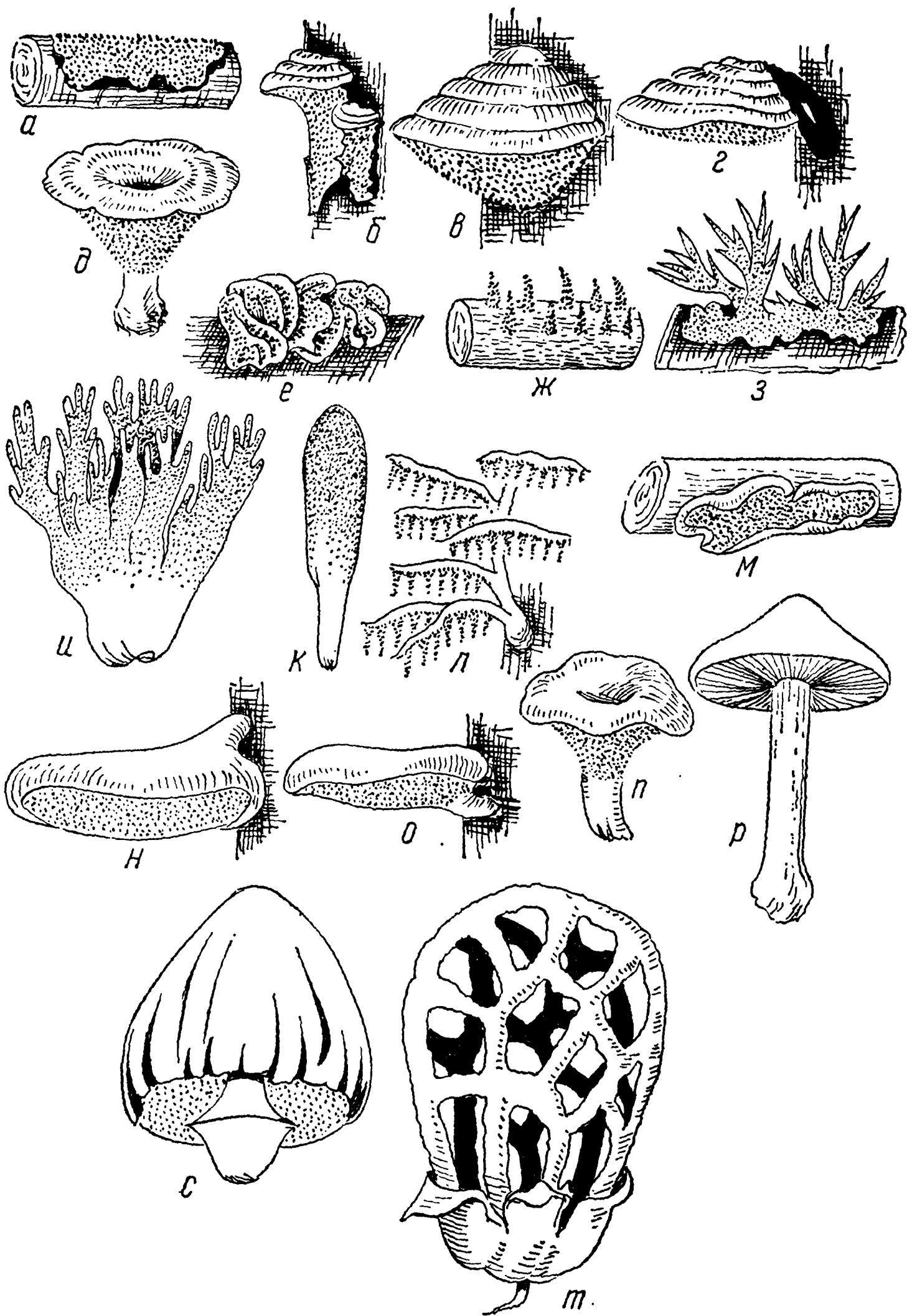


Рис. 17. Типы плодовых тел базидиомицетов:

а — кортициоидное; б — стероидное; в — фомитоидное; г — ганодермоидное; д — гиднеллоидное; е — тремеллоидное; ж — мукронеллоидное; з — кортицирамоидное; и — рамариоидное; к — клавариоидное; л — герициоидное; м — резупинатное; н — цифеллоидное; о — плевротоидное; п — кантареллоидное; р — агарикоидное; с — секотиоидное; т — гастроидное.

1.3.2.3. МОРФОЛОГИЯ ШЛЯПКИ

Шляпки базидиомицетов различаются по размерам, форме, окраске, характеру поверхности и другим признакам, имеющим важное таксономическое значение. Шляпка служит для прикрепления гименофора и его защиты; ее мякоть является источником снабжения базидий водой, необходимой для отбрасывания спор. Диаметр шляпки варьирует от 0,5—1 (у большинства видов 3—5—10) до 20—40—60 см. Поверхность шляпок бывает блестящей, зернисто-блестящей, матовой, сухой, влажной, клейкой, слизистой, голой, чешуйчатой, войлочной, бархатистой, зернистой, с мучнистым налетом (мучнистость может быть стирающейся или не стирающейся), ареализованной. Иногда вся поверхность покрыта жилками или морщинистая, бугристая, неровная. Кожица легко, трудно или совсем не отделяется от мякоти шляпки. Шляпки бывают выпуклые, колокольчатые, цилиндрические, конические, шаровидные, уховидные, полушаровидные, параболические, плоские или вогнутые. По отношению к субстрату различают шляпки сидячие, приросшие боком, копытообразные, полуотогнутые. Край шляпки может быть прямым и загнутым вниз, чаще сначала загнутый или даже завернутый внутрь, а впоследствии плоский; край шляпки бывает лопастный, волнистый или разрезной; иногда гименофор кончается, не доходя до края шляпки, тогда край носит название «стерильного» [73]. Край шляпки может быть гладким, цельным, более или менее глубоко бороздчатым, складчатым или лопастно-рассеченным.

1.3.2.4. МОРФОЛОГИЯ ПОКРОВОВ

Покровы плодовых тел, особенно шляпки, имеют сложное строение. У видов, имеющих покрывало, поверхностный слой образован остатками общего покрывала в виде хлопьев, часто легко стирающихся, или сфероцистами, лежащими сплошным слоем. Под остатками покрывала располагается сплошной слой кутикулы, или кожицы, которая часто разрывается в процессе роста на отдельные чешуйки. Кутикула выполняет функции защиты плодового тела от неблагоприятных факторов (например, избытка испарения), а также от возможных механических повреждений. Она образована сплетением гиф основной и соединительной тканей или клетками; иногда кутикула имеет гименовидное строение: грушевидные клетки расположены наподобие базидий в гимениальном слое. В кутикуле могут присутствовать дерматоцистиды, волоски, хлопья примордиальных гиф. Чешуйки кутикулы, образующиеся вследствие роста гриба, представляют собой гифы, в основании соединенные в пучки. Зернистые и морщинистые ткани, образующиеся на поверхности кутикулы, состоят из неправильно округлых приблизительно равных размеров клеток, лежащих ровным слоем в несколько рядов или формирующихся в пирамидальные, иногда кубические группы, довольно равномерно разбросанные по поверхности кутикулы. Под кутикулой располагаются субкутикулярный слой и мякоть шляпки. Строение покровов шляпки имеет важное таксономическое значение.

1.3.2.5. МОРФОЛОГИЯ МЯКОТИ ШЛЯПОК

Мякоть шляпки многих высших базидиомицетов состоит из двух типов тканей — *основной* и *соединительной*. Основная ткань обычно образована толстостенными гифами, соединительная — более тонкими

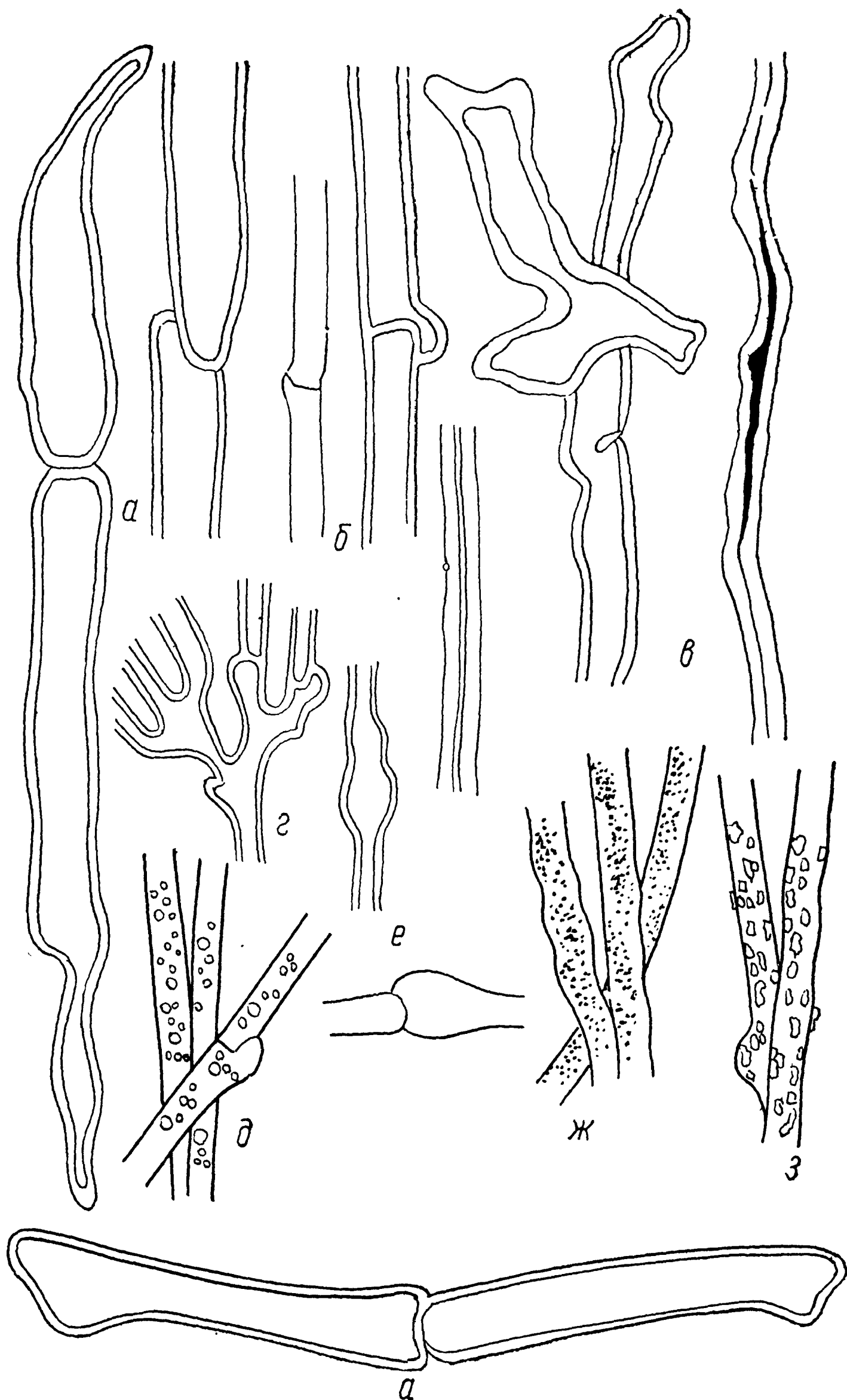


Рис. 18. Гифы ежевиковых грибов:

a — сосудистые; *б* — тонкостенные с пряжками; *в* — толстостенные; *г* — ветвящиеся; *д* — покрытые каплями масла; *е* — со вздутием; *ж* — с зернистой инкрустацией на поверхности; *з* — инкрустированные кристаллами.

и изогнутыми. У представителей порядка Russulales основная ткань состоит из гнезд сфероцист и мякоть имеет гетеромерное строение. Кроме основной и соединительной тканей карпофоры многих видов содержат гифы проводящей системы. У видов родов *Muscena*, *Lactarius*, *Lentinellus* имеются сосудистые гифы — *латициферы*, содержащие млечный сок. У сыроежек эти вещества находятся в маслоносных гифах — *олеиферах*, которые оканчиваются в гимениальном слое. Окраска мякоти грибов разнообразная, обычно беловатая. При автооксидации мякоть большинства видов меняет цвет, что является важным таксономическим признаком. Консистенция мякоти, ее вкус и запах также имеют важное таксономическое значение. По консистенции различают студенистую, слизистую, восковатую, кожистую, пробковую, деревянистую мякоть и др. По вкусу горькую, кислую, острую, сладковатую (т. е. без особого вкуса), сладкую и соленую. При наличии млечного сока учитывают его цвет, консистенцию, обильность выделения, вкус, изменение цвета на воздухе.

1.3.2.6. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРА ГИФ

Основу плодовых тел базидиальных грибов составляют вегетативные гифы. Ширина гиф колеблется примерно в пределах 1–15 мкм. Обычно у видов с мясистой консистенцией плодовых тел гифы тонкостенные или со слабоутолщенными стенками, а у видов с кожистой и деревянистой консистенцией плодовых тел утолщение оболочки гиф

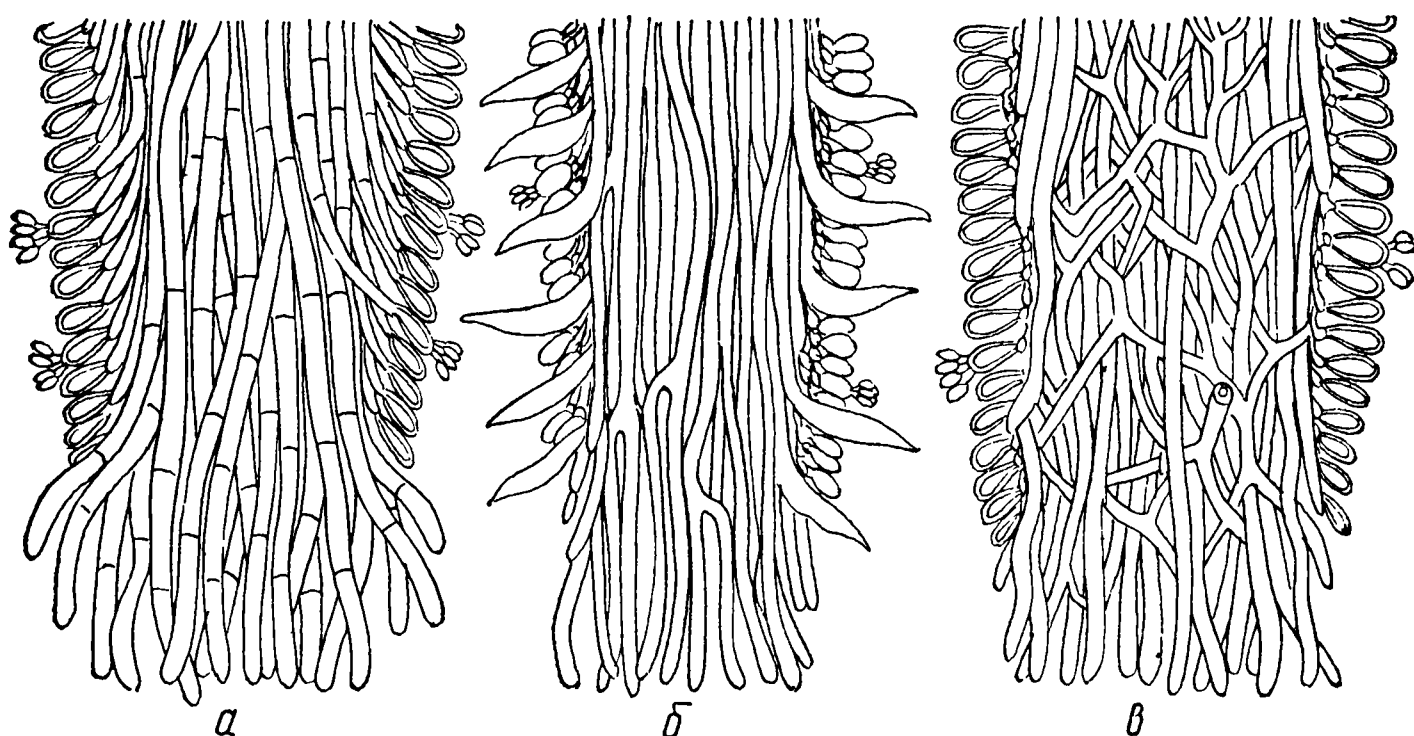


Рис. 19. Гифальные системы базидиомицетов:

а — мономитическая; *б* — димитическая; *в* — тримитическая.

достигает иногда такой степени, что ведет к сильному сужению просвета. На всем протяжении гифы сохраняют более или менее постоянный диаметр. Разрастаясь, они в большей или меньшей степени ветвятся. Поверхность гиф бывает зернистой, инкрустированной бесцветными или окрашенными комочками неправильной формы или кристаллами. В редких случаях гифы покрыты капельками масла или смолистым веществом (рис. 18).

Морфологической особенностью гиф большинства высших базидиомицетов являются *пряжки* — небольшие, дугообразной формы образования, расположенные у поперечной перегородки гифы и соединяющие две ее клетки.

В современной систематике базидиомицетов, главным образом порядка *Arhyllorphorales*, морфология гиф имеет решающее значение [551, 556]. Е. Корнер [551] выделяет три типа гиф плодовых тел трutowых грибов: *генеративные* (generative), *скелетные* (skeletal) и *связывающие* (binding). Генеративные гифы дают начало скелетным и связывающим гифам, они тонкостенные с перегородками, ветвящиеся, с пряжками или без них. Скелетные гифы придают прочность плодовому телу, они толстостенные, обычно не ветвящиеся и без перегородок. Связывающие гифы развиваются вне зоны роста плодовых тел, они сильно ветвящиеся, узкие, изредка с перегородками, толстостенные, перепутанные, с ограниченным ростом [323].

Различают следующие гифальные системы в структуре плодовых тел: *мономитическую* (monomitic), состоящую только из генеративных гиф; *димитическую* (dimitic), состоящую из генеративных и скелетных или связывающих гиф; *тримитическую* (trimitic), состоящую из гиф генеративных, скелетных и связывающих (рис. 19). Принцип гифальных систем утвердился в систематике многих групп базидиальных грибов [552].

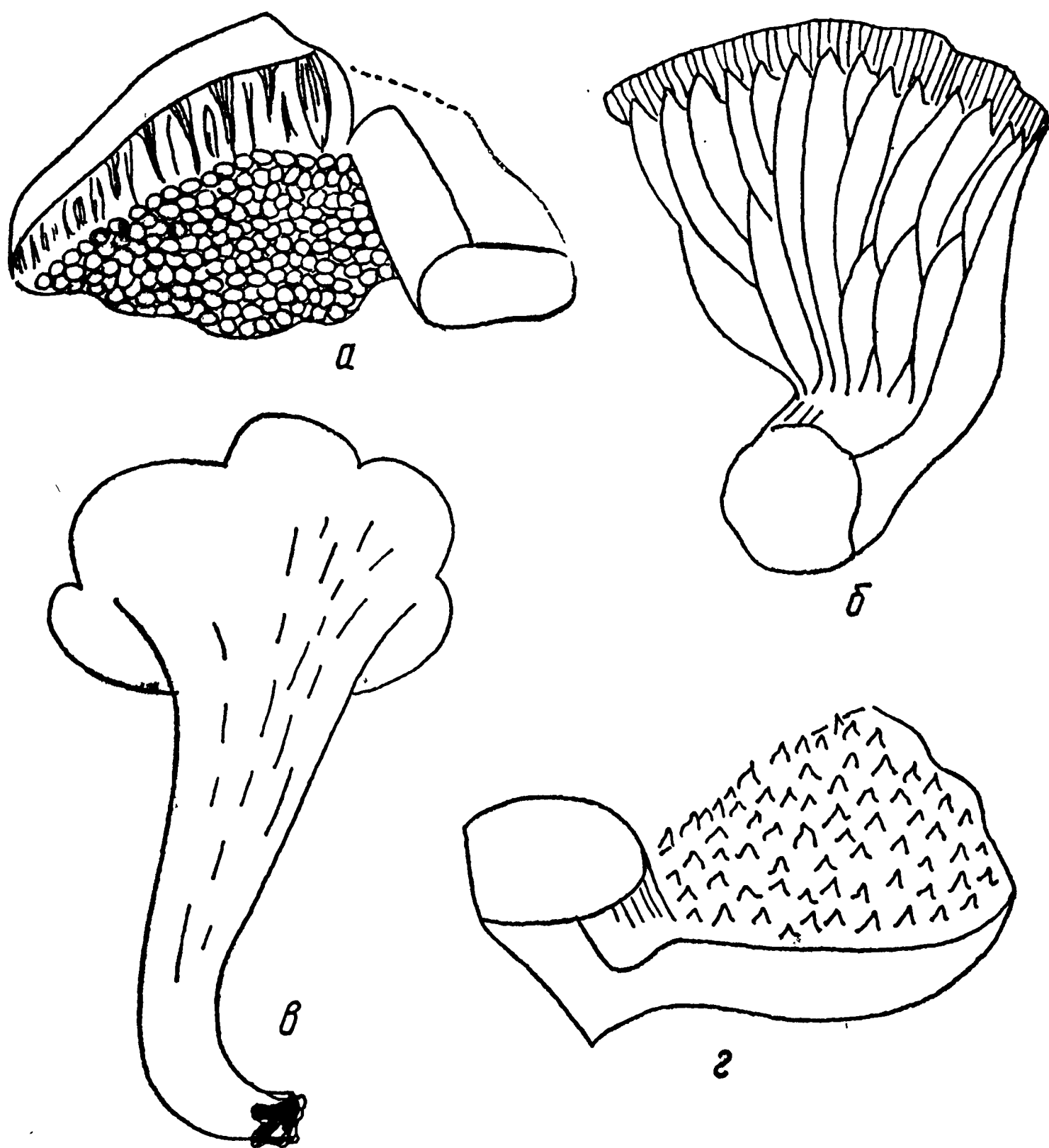


Рис. 20. Основные типы гименофора базидиомицетов:
 а — трубчатый; б — пластинчатый; в — гладкий; г — шиповатый.

1.3.2.7. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРА ГИМЕНОФОРА

Гименофор — часть плодового тела, в которой развивается гимениальный слой, может быть гладким, жилковатым, шиповатым, губчатым, бородавчатым, трубчатым, пластинчатым (рис. 20; см. рис. 17). У плодовых тел с более или менее развитыми шляпками гименофор расположен на стороне, обращенной к земле. У некоторых более примитивных представителей базидиальных гименофор расположен на верхней поверхности плодового тела.

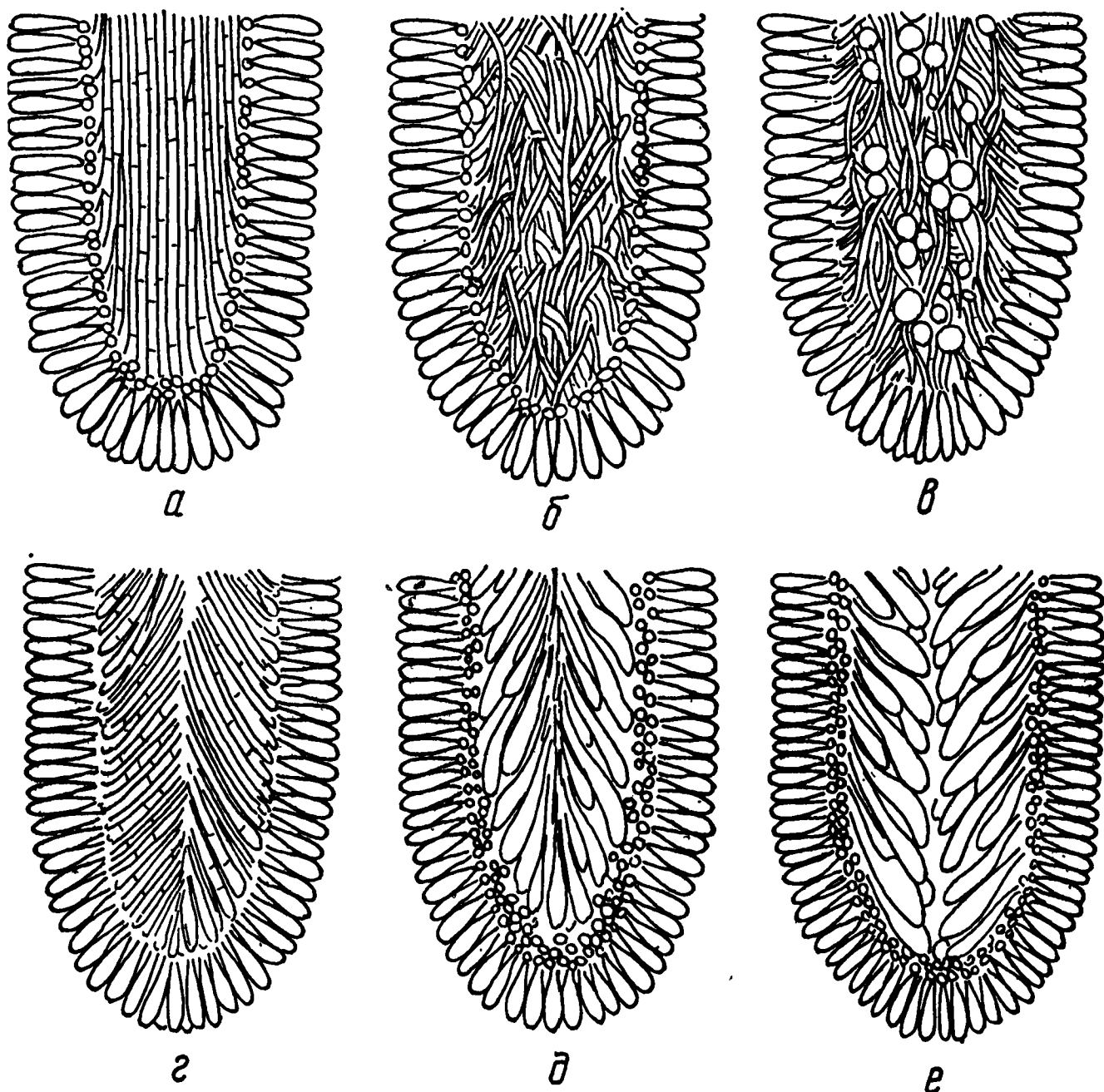


Рис. 21. Типы гименофоральной трамы базидиомицетов:

a — правильная; *b* — неправильная; *в* — неправильная со сфероцистами; *г* — билатеральная; *д* — псевдобилатеральная; *е* — инверсная.

У высших базидиомицетов различают гименофор *приросший*, или *прикрепленный*, когда его выступы, например трубочки или пластинки, плотно срастаются с ножкой; если гименофор не достигает ножки, его считают *свободным*. Гименофор может быть *выемчатым*, в этом случае пластинки или трубочки прикрепляются только в верхней части, образуя у ножки выемку, или *нисходящим*, когда его выступы нисходят на ножку.

Развитие базидиомицетов шло не только в направлении усложнения и совершенствования плодового тела, но и в направлении совершенствования гименофора, увеличения его спороносящей поверхности. Значение гименофора как систематического признака огромно при определении таксонов различного ранга от порядка (например, Agaricales, Tricholomatales — гименофор пластинчатый) до вида

(например, уже по одному виду шипов можно легко определить *Radulum orbiculare* и *R. pendulinum* семейства Hydnaceae).

Гименофор состоит из внутренней стерильной части — *гименофоральной трамы* * и покрывающего гименофор *гимениального слоя*. Трама состоит из нескольких слоев, расположенных в середине пластинки, трубочки, шипа. По строению различают шесть типов трамы: *правильная, неправильная, неправильная со сфероцистами, билатеральная, псевдобилатеральная, инверсная* (рис. 21). Правильная трама состоит из параллельных гиф, неправильная — из переплетающихся,

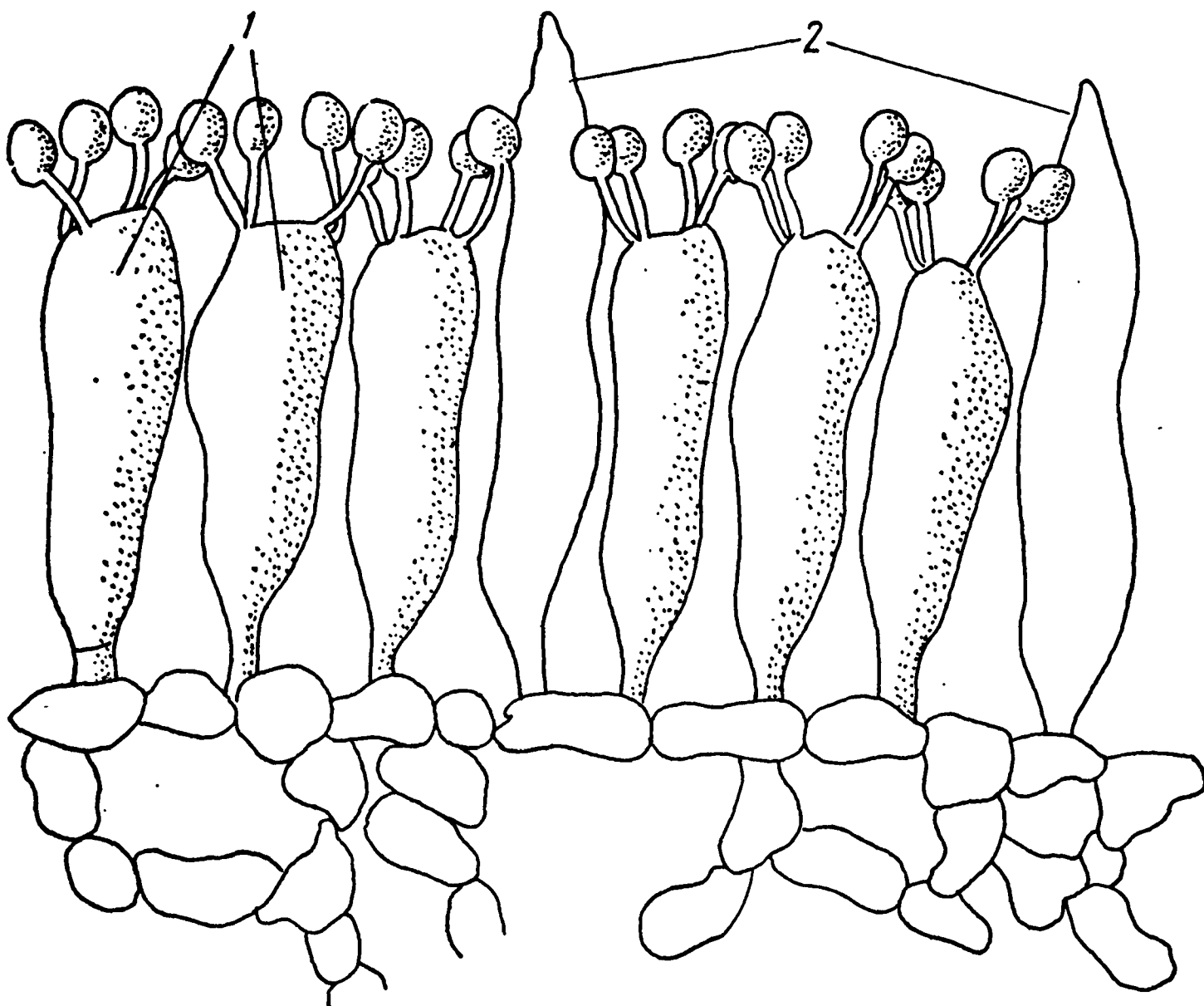


Рис. 22. Расположение базидий и цистид в гимениальном слое:
1 — базидии; 2 — цистиды.

перепутанных гиф. В неправильной со сфероцистами траме между переплетающимися, перепутанными гифами имеются вкрапления сфероцист. Билатериальная трама состоит из медиостратума — узкого центрального пучка почти параллельных гиф и отходящих от него косо в обе стороны почти параллельных гиф, образующих более широкие слои, чем медиостратум. Псевдобилатеральная трама имеет более широкий медиостратум с отходящими от него широкими вздутыми к окончанию гифами. Инверсная трама подобна билатеральной, отличающаяся от нее противоположным направлением боковых гиф.

Тип строения трамы — важный таксономический признак на уровне семейства и рода.

Обычно между трамой и гимениальным слоем располагается *субгимениальный слой* относительно однородного строения.

* В литературе обычно употребляют термин трама, а не гименофоральная трама.

Гимениальный слой выстилает гименофор и состоит из базидий, несущих базидиоспоры. Иногда базидии перемешиваются с бесплодными элементами гимениального слоя — цистидами (рис. 22).

1.3.2.8. МИКРОСКОПИРОВАНИЕ ГИМЕНИАЛЬНОГО СЛОЯ

Для изучения гимениального слоя необходимо сделать лезвием тонкий поперечный срез через пластинку (трубочку, шип и т. п.), затем препаровальной иглой перенести его на предметное стекло и поместить в каплю воды или 5%-ной щелочи (KOH или NaOH), что способствует набуханию высохших оболочек спор, клеток и просветляет препарат. Покрыв срез покровным стеклышком, рассматривают его сначала при малом (10×7), а затем при большом (10×40) увеличении микроскопа. С помощью окулярной линейки измеряют в микронах длину и ширину всех интересующих микроструктур. Если строение тех или иных микроструктур рассмотреть не удастся, то применяют увеличение 15×60 , 15×90 , используя иммерсионную систему. Изучают форму и размеры базидий, количество спор на базидиях, размеры и форму, цвет и расположение спор, цистид, структуру гименофоральной трамы (рис. 23). Для более четкого выделения микроструктур гимениального слоя применяют красящие вещества.

1.3.2.9. БАЗИДИИ

Базидии бывают одноклеточные и многоклеточные с поперечными, косыми и продольными перегородками, булавовидные, веретеновидные, цилиндрические, удлинено-овальные, удлинено-булавовидные, овально-цилиндрические, широкоовальные, прямые или изогнутые (рис. 24). На базидиях обычно образуется четыре базидиоспоры, однако встречаются виды с двумя, тремя, шестью и восьмью. Базидиоспоры соединяются с базидией нитевидными или роговидными отростками — стеригмами. Споры на базидиях созревают постепенно, поэтому в гимениальном слое одновременно имеются базидии, на которых еще не развились стеригмы, вполне сформировавшиеся базидии со стеригмами и спорами в разной стадии развития и уже отбросившие споры базидии, которые затем спадаются.

Размеры спор, стеригм и базидий в значительной степени зависят от характера генеративной гифы и связаны константами, определенными для видов и родов [37, 548—550, 553, 686, 731]. Четкое установление этих зависимостей может служить одним из надежных критериев вида и рода у высших базидиомицетов.

В основу анализа геометрических особенностей расположения спор на базидии положено изучение боковых и торцевых положений базидий со спорами. Для этого необходимы ясные, четкие фотографии бокового и торцевого положения базидии со спорами при большом увеличении микроскопа. В связи с тем что базидию нельзя одновременно рассмотреть с торца и сбоку, для каждого вида определяют средние параметры на основании 100—1000 измерений, т. е. получают данные для «идеальной» базидии изучаемого вида.

Поскольку большинство высших базидиомицетов имеет четыре споры на базидии, за единицу предлагается рассмотрение тетрады ($u = 4$). Четыре споры при торцевом обозрении представляются углами квадрата *. Можно предположить, что споры, расположенные по углам

* При $u = 3$ и $u = 5$ споры при торцевом обозрении рассматривают соответственно как углы равностороннего треугольника или пятиугольника.

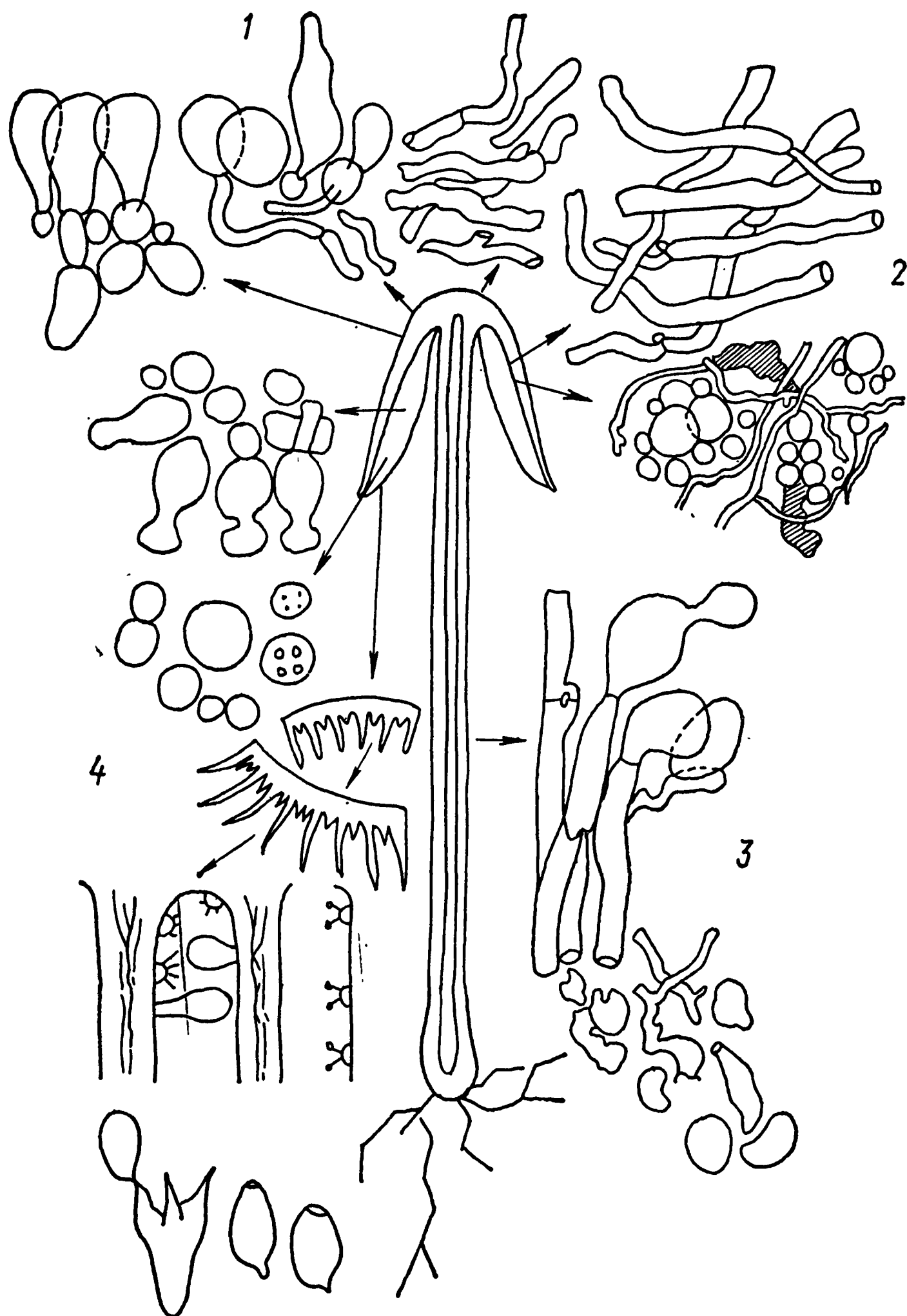


Рис. 23. Схема микрофотографирования гименофора и других элементов карпофора:

1 — элементы кутикулы шляпки; 2 — элементы мякоти шляпки; 3 — элементы поверхности ножки; 4 — элементы гимениального слоя.

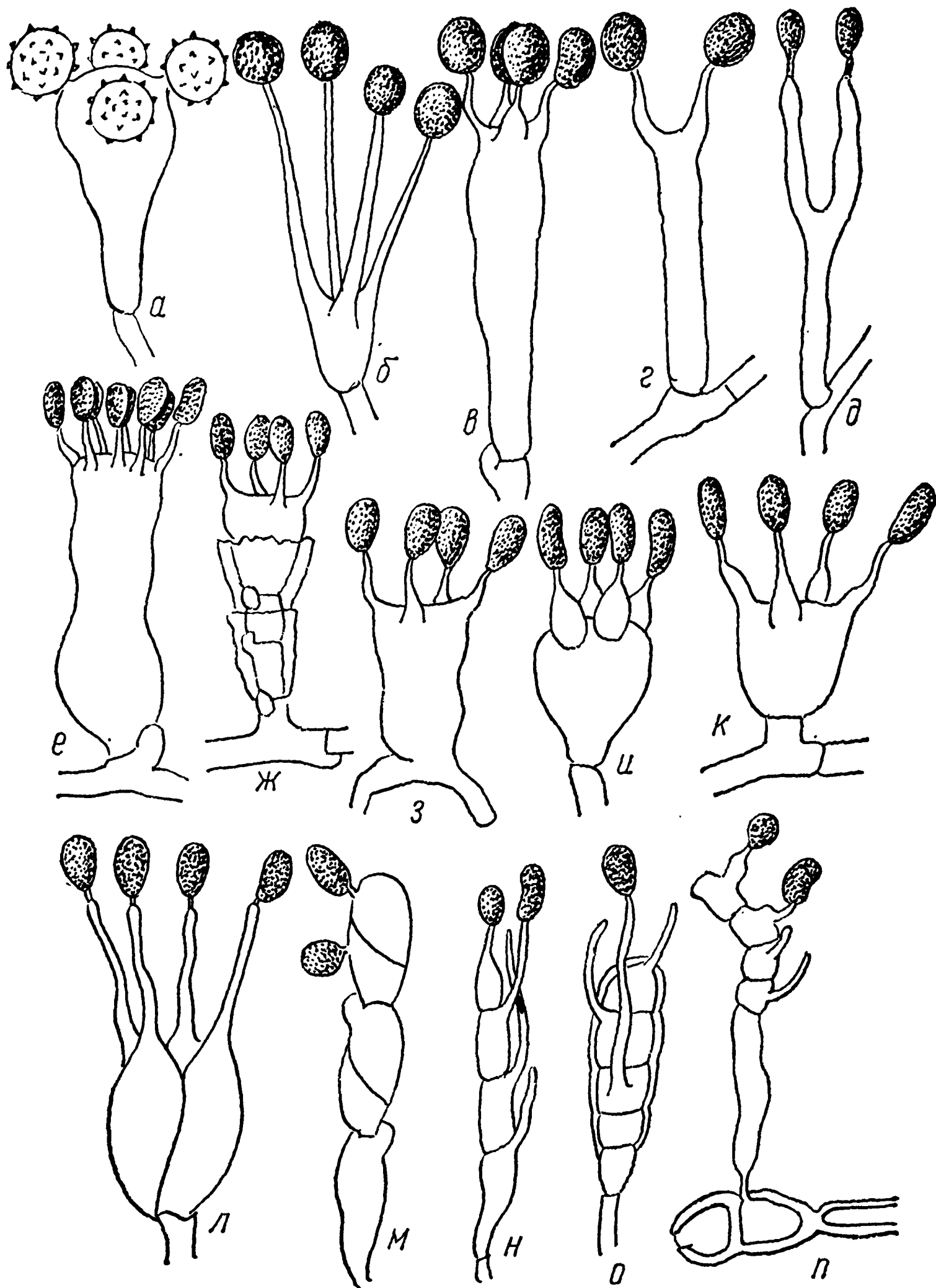


Рис. 24. Холобазидии (а—к) и фрагмобазидии (л—п).

квадрата, окружены наружным кругом S' (рис. 25), центральным кругом S'' , проходящим через центры спор, и внутренним кругом S''' . Кроме того, существует реальный круг базидии ω , диаметр которого равен максимальной ее ширине. Для стеригм определяют стеригматический круг M , проходящий через вершины стеригм, и круг стеригматического пятна m , являющийся проекцией основания стеригм, d — очерк споры (круг диаметра d), δ — угол между осью AC и

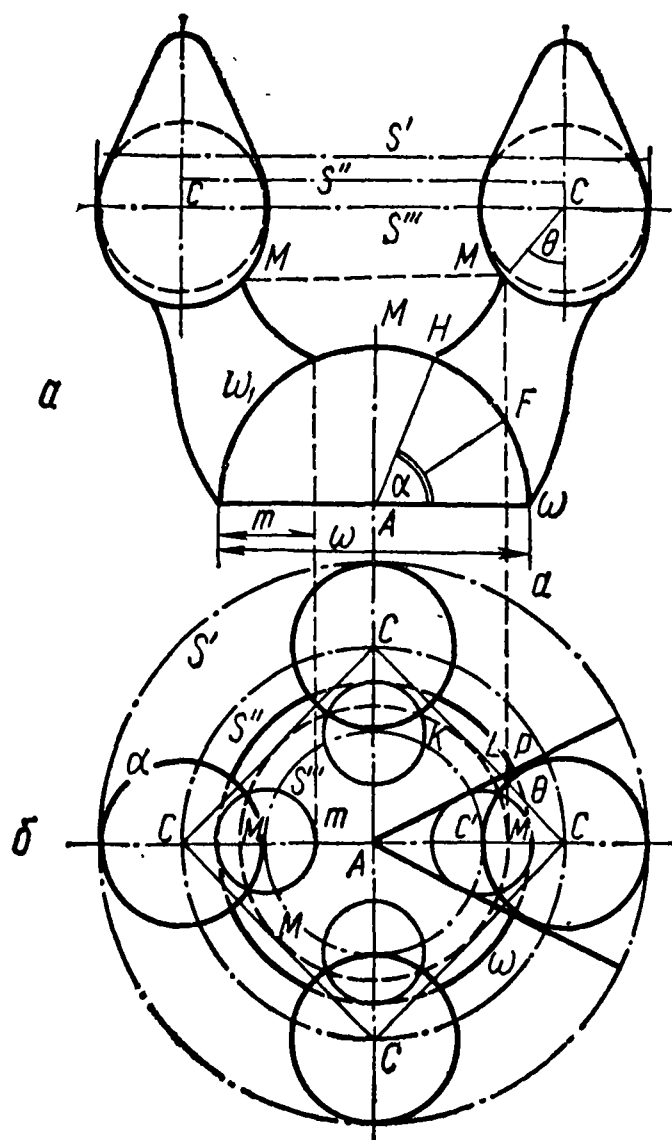


Рис. 25. Геометрия базидий:

a — вид сбоку; *б* — торцевой вид.

касательной AP к очерку споры, Θ — угол споры (угол CLM). На основании данных получают формулы, определяющие параметры базидии как функции δ , d и других аргументов [37]. Ниже приведен перечень некоторых зависимостей базидии, имеющих таксономическое значение.

1. Отношение диаметров внешнего круга и очерка базидии равно отношению диаметров центрального и внутреннего кругов.
2. Отношение диаметров внешнего круга и очерка базидии равно отношению диаметров очерка споры и стеригматического пятна.
3. Отношение диаметров центрального и внутреннего кругов равно отношению диаметров очерка споры и стеригматического пятна.
4. Отношение диаметров центрального круга и очерка споры равно отношению диаметров внутреннего круга и стеригматического пятна.

1.3.2.10. БАЗИДИОСПОРЫ И ДРУГИЕ СПОРОНОШЕНИЯ

Базидиоспоры разнообразны по форме, размерам, цвету. Они бывают круглые, эллипсоидные, овальные, яйцевидные, булавовидные, цилиндрически-овальные, ребристо-овальные, угловато-овальные, угловато-округлые, гладкие, шероховатые, бородавчатые, шиповатые, ребристые, бугристые и др. (рис. 26); бесцветные, розовые, ржаво- или охристо-коричневые, коричневые, пурпурно- или фиолетово-бурые, черно-бурые, черные. Как правило, базидиоспоры асимметричные, неравнобокие, брюшная сторона их слабовыпуклая, плоская, иногда даже вогнутая, а спинная — более выпуклая. Апикулюс, с помощью которого спора прикрепляется к стеригме, расположен ближе к брюшной стороне споры. У многих видов на противоположном конце споры от апикулюса находится пора прорастания.

В оболочке базидиоспор, считая изнутри, обычно различают следующие слои: тонкий и бесцветный *эндоспорий* (окрашенный слой у представителей с окрашенными спорами) или наиболее толстый слой у представителей с бесцветными спорами; *эписпорий* и *экзоспорий*, из которого происходит орнаментация спор. По данным электронно-микроскопических исследований, например, у агарикальных грибов, в оболочке спор различают до шести слоев [728]. В протоплазме спор часто имеется одна или несколько капель масла, флюоресцирующих под микроскопом.

Форма спор, их размер, характер оболочки, наличие или отсутствие поры прорастания, цвет, количество их на базидии играют важную роль в систематике базидиомицетов. У некоторых представителей на гаплоидном мицелии (например, *Coprinus*), а у некоторых на диплоидном (например, *Pholiota*) образуются конидиальные споронии типа *оидии* (короткие округлые или удлиненные тонкостенные клетки,

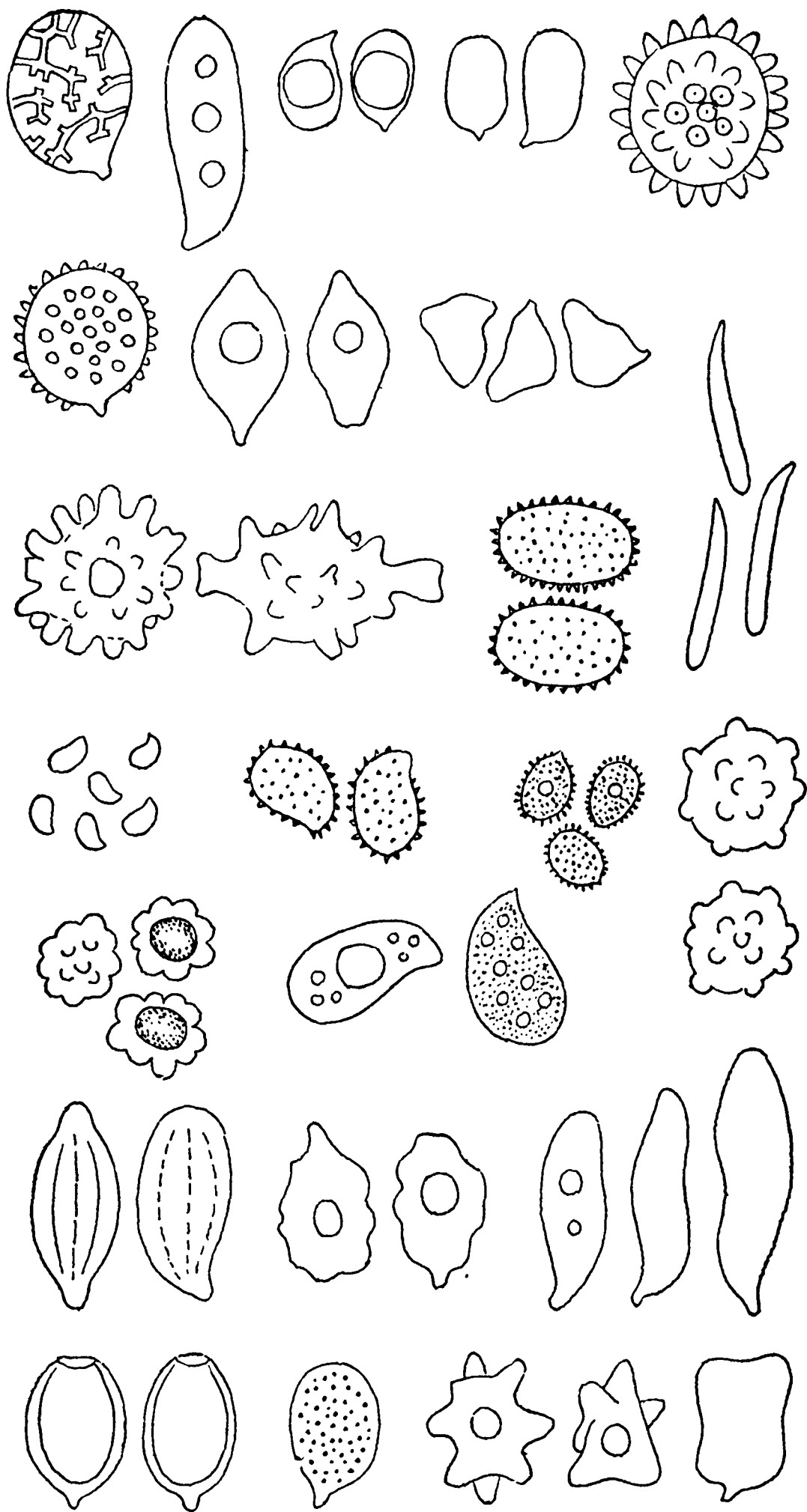


Рис. 26. Формы спор некоторых базидиомицетов.

образующиеся при сегментации мицелия). У видов рода *Tulasnella* и других конидии могут образовываться из прорастающих базидиоспор. Для некоторых видов характерно образование шаровидных или широкоовальных хламидоспор — клеток, отделенных от других клеток гиф или конидий толстой оболочкой, которые развиваются терминально или интеркалярно; обычно они окрашены, содержат много липидов и выполняют роль покоящихся спор.

1.3.2.11. ЦИСТИДЫ

Цистиды — стерильные элементы гимениального слоя — у базидиомицетов имеют разнообразное строение, происхождение и местоположение.

Цистиды бывают цилиндрической, булавовидной, веретеновидной формы; часто встречаются ампуловидные цистиды с сильно удлинённой или шарообразно вздутой вершиной. Иногда цистиды имеют перегородки и нередко снабжены пряжками. Стенки цистид могут быть от очень тонких до сильно утолщённых. Обычно цистиды бесцветны, часто их поверхность инкрустирована различными по размерам и форме комочками или кристаллами. Инкрустирована нередко почти вся поверхность цистид, но чаще только их вершина (рис. 27).

По происхождению различают цистиды гимениальные и траматические. *Гимениальные цистиды* возникают так же, как и базидии, из-под гимениального слоя. *Траматические цистиды* начинают развиваться в траме, затем, постепенно продвигаясь к гимениальному слою, проникают в него и в конце развития обычно далеко выступают за его пределы. У агарикальных грибов различают *плевроцистиды*, развивающиеся на боковой поверхности пластинок, и *хейлоцистиды*, развивающиеся по краю пластинок. Стерильные элементы гимения, морфологически сходные с гифами трамы, называются *цистидиолами*. Цистидиолы ничем не отличаются от гиф плодового тела, они выступают за пределы гимениального слоя, при этом на конце они часто несут шапочку из почти черного, аморфного смолистого вещества. Траматические цистиды с маслянистым содержимым называются *глеоцистидами*.

В качестве систематического признака цистиды имеют важное значение при разграничении видов, родов и семейств.

1.3.2.12. НОЖКА

У высших базидиомицетов ножка служит более или менее твердой опорой плодовому телу. На ней располагается шляпка, часто достигающая очень больших размеров. Так, например, у *Agaricus kühnerianus* Heimp. диаметр шляпки достигает 60 см. Ножка формируется из располагающихся в вертикальном направлении, плотно соединенных между собой гиф. У крупноплодных форм устойчивость увеличивается также благодаря постепенному расширению ножки по направлению книзу, часто заканчивающемуся клубневидным вздутием. Ножка поднимает гименофор над почвой или другим субстратом, что способствует лучшему рассеиванию спор.

У большинства видов ножка *центральная*, у некоторых — *эксцентрическая* и *боковая*. Изредка ножка отсутствует, в таком случае шляпка прикрепляется к субстрату боком. По форме ножки бывают цилиндрические, иногда очень тонкие, капилляровидные, прямые или кривые, утолщенные к середине, к вершукке или к основанию, в основании часто с корневидным отростком (рис. 28). Ножки бывают сухие, клейкие, слизистые, голые, гладенькие, чешуйчатые, волокнистые и другие, с кольцом, с кольцом и вольвой в основании, только с вольвой без кольца, без кольца и вольвы (рис. 29). Внутри ножка содержит ватобразную или более мягкую ткань, которая может быть свободной или приросшей. Ножка может быть также сплошной или полый; в последнем случае говорят о трубчатой ножке. Основание ножки часто бывает окрашенным или покрытым войлочным налетом мицелия.

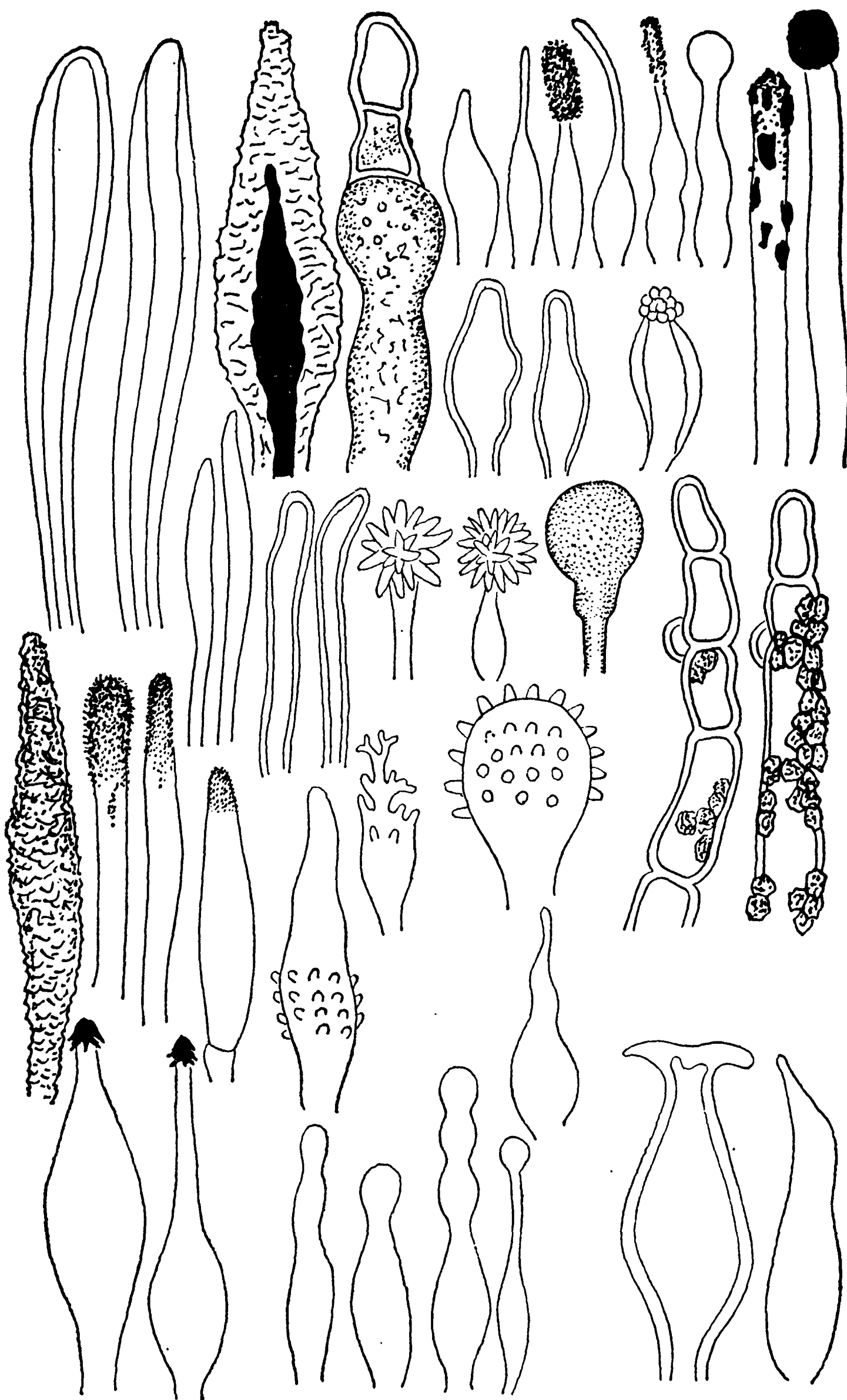


Рис. 27. Формы цистид некоторых базидиомицетов.

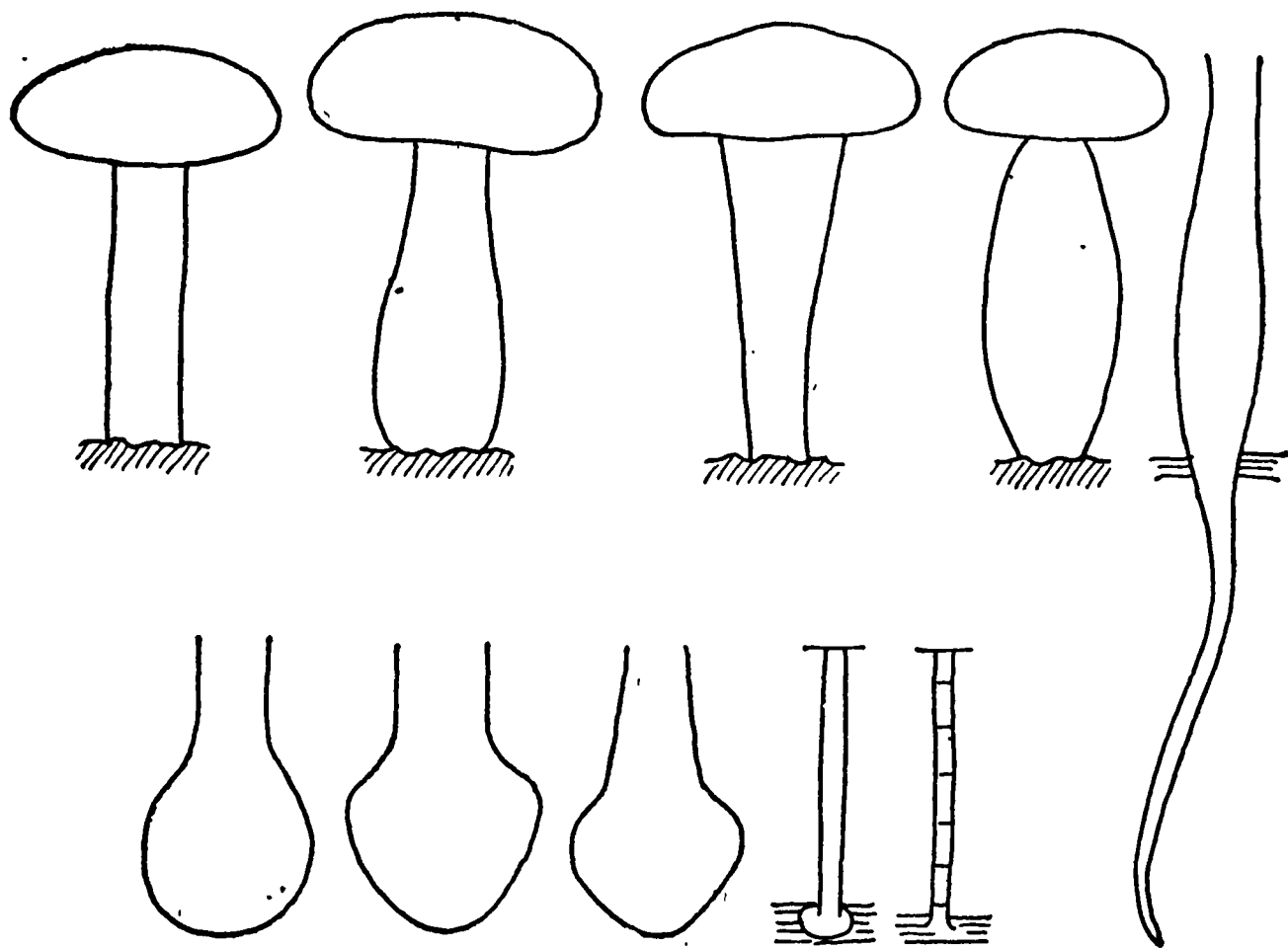


Рис. 28. Формы ножек базидиомицетов.

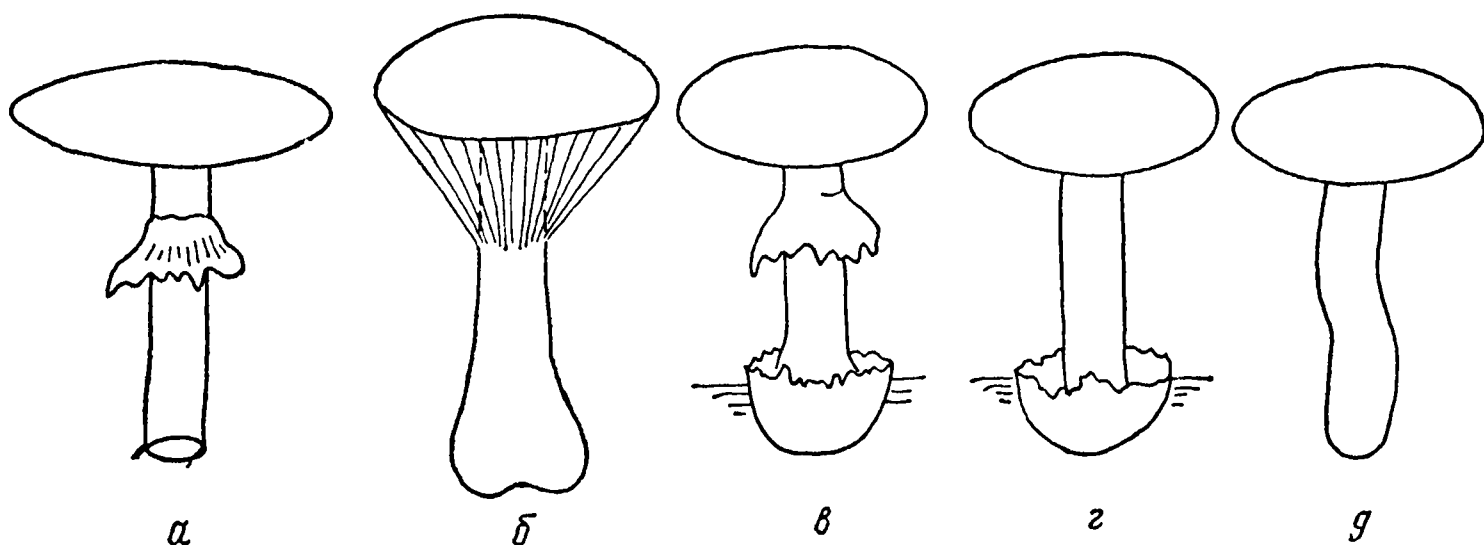


Рис. 29. Элементы морфологии плодовых тел базидиомицетов:

а — с кольцом; *б* — с картиной; *в* — с кольцом и вольвой; *г* — с вольвой; *д* — без кольца и вольвы.

От основания ножки у некоторых видов базидиомицетов отходят плотные разветвленные мицелиальные тяжи. У *Armillariella mellea* (Fr.) Karst., например, они черные, блестящие, очень длинные и плотные. Такие тяжи называются *ризоморфами*, длина их достигает нескольких десятков метров при ширине 0,2—10 см и более. Для некоторых видов базидиомицетов характерно образование склероциев, которые способствуют сохранению жизнедеятельности гриба в неблагоприятных условиях (засуха и т. п.).

Склероции — образования часто неправильной формы, обычно состоящие снаружи из окрашенных толстостенных гиф, служащих для защиты от внешних воздействий, и внутренних тонкостенных живых гиф, из которых впоследствии развиваются плодовые тела. Склероции содержат запасной питательный материал, необходимый для роста плодового тела. У некоторых видов наличие склероциев — важный видовой признак.

1.3.2.13. МАКРО- И МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ХИМИЧЕСКИЕ ЦВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ

В связи с тем что ткани грибов определенного вида или рода содержат одно или несколько специфических веществ, большое значение для систематики базидиомицетов приобретают химические цветовые реакции. Часто близкие виды, трудно различимые на основе морфологических особенностей, легко определяются по цветовым химическим реакциям.

Естественную химическую цветовую реакцию легко наблюдать, например, у *Agaricus xanthodermus* Gen при автооксидации мякоти, которая в основании ножки окрашивается в ярко-желтый, хромово-желтый цвет.

С начала XX ст. и до последнего времени ученые изучают действие химических реактивов на различные структуры грибов [658, 660, 696, 698, 764, 773—775]. В настоящее время наблюдается две диаметрально противоположные тенденции в отношении применения химических цветовых реакций в целях идентификации: 1) выделение новых таксонов различного ранга (даже родов) на основе химических реакций без изучения их зависимости от внешних факторов и условий произрастания грибов; 2) отрицание значения химических цветовых реакций как дополнительного таксономического критерия.

Химические цветовые реакции подразделяют на макроскопические, проводимые на карпофорах и их частях, и микроскопические, проводимые на спорах, базидиях, цистидях и других микроструктурах [696, 829]. Перечень основных реактивов, которые применяют при изучении систематики грибов и способы их приготовления приведены в приложении 1.

1.3.3. КЛАСС DEUTEROMYCETES

1.3.3.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Класс *Fungi imperfecti*, или *Deuteromycetes* по современной классификации, входит в подотдел *Deuteromycotina*, который вместе с подотделами *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina* и *Basidiomycotina* относится к отделу *Eumycota*.

Существует две точки зрения на несовершенные грибы. Одни исследователи рассматривают эту группу как искусственную, представители которой являются лишь стадиями развития сумчатых и базидиальных грибов. Другие же считают, что в процессе эволюции многие несовершенные грибы полностью утратили стадию полового спороношения, а размножаются спорами экзогенного или псевдоэндогенного происхождения — конидиями. Некоторые виды имеют сумчатую стадию, но она образуется крайне редко, и ее роль в распространении и сохранении вида становится все более незначительной.

В настоящее время этот класс рассматривается не как формальная сборная группа, а как новая, находящаяся в процессе становления эволюционная ветвь грибов полифилетического происхождения, развитие которой идет в направлении совершенствования конидиального аппарата — основного органа размножения — и компенсации отсутствующего полового процесса механизмами (гетерокариозис, парасексуальный цикл), обеспечивающими перераспределение наследственного материала [102].

Представители класса *Deuteromycetes* часто являются конидиальными стадиями совершенных грибов, утратившими с ними связь и перешедшими к самостоятельному существованию. Совершенные (половые) стадии грибов для своего развития требуют специфических условий и предназначены не столько для распространения, сколько для сохранения вида. Конидиальные стадии характеризуются быстрым ростом, способностью образовывать многочисленные бесполое споры — конидии, прорастающие с образованием таких же конидиальных форм или при благоприятных условиях — совершенных стадий гриба. Переход к самостоятельному существованию конидиальных стадий совершенных грибов осуществлялся в процессе длительного воспроизведения, широкого распространения в окружающей среде и приспособления к субстратам, не свойственным для развития половых совершенных стадий.

Для дейтеромицетов характерны разнообразные способы конидиального спороношения: образование конидий непосредственно на вегетативном мицелии путем его деления (фрагментации), почкования, а также образования выростов или сложно устроенных конидиеносцев, морфологически отличающихся от гиф вегетативного мицелия. При этом могут образовываться одиночные конидии или они формируют цепочки или головки. Разнообразны форма и строение конидий.

Наибольшее распространение получила одна из первых подробно разработанных классификаций несовершенных грибов П. Саккардо, в основу которой положены окраска мицелия и конидий, способ их образования и форма [760]. По этой системе дейтеромицеты делятся на три порядка:

1. *Hymenocetales* — конидии образуются на гифах вегетативного мицелия или на конидиеносцах. Конидиеносцы собраны в пучки — коремии, спородохии или же возникают одиночно на поверхности субстрата.

2. *Melanconiales* — конидиеносцы развиваются тесным слоем на ложе, погруженном в субстрат и состоящем из плотного сплетения гиф.

3. *Sphaeropsidales* — конидиеносцы образуются внутри шаровидных вместилищ — пикнид.

Несмотря на признание и широкое распространение, эта система имеет существенные недостатки.

Не меньшей популярностью пользуется классификация А. А. Поттебни [353], которая наиболее полно учитывает эволюцию спорообразования у несовершенных грибов и включает пять порядков:

1. *Hymeniales* — конидиеносцы отходят от гиф или выступают на поверхность субстрата, одиночные или в пучках, но не сросшиеся. Конидии образуются непосредственно на гифах путем расчленения гиф или почкования.

2. *Coremiales* — конидиеносцы, сросшиеся в пучки (коремии), расположены на поверхности субстрата.

3. *Aservulales* — поверхностные или погруженные в субстрат конидиеносцы развиваются сплошным слоем на плотном сплетении гиф, образуя спороложе (подушечки).

4. *Pseudorycnidiales* — конидиеносцы образуются в ложных пикнидах.

5. *Rycnidiales* — конидиеносцы заключены в истинные пикниды, оболочка их хорошо выражена.

Были сделаны попытки улучшить указанные системы, основанные на морфологических признаках, и создать более совершенную систему

грибов, используя иные критерии [139, 331, 409, 498, 508, 545, 567, 620, 747, 783, 798, 818].

По классификации Айнсворса [491] класс Deuteromycetes делится на следующие типы:

1. Blastomycetes — главным образом аспорогенные дрожжи, имеющие сродство с сумчатыми и базидиальными грибами.

2. Hyphomycetes — образуют конидии на простых конидиеносцах, в коремиях, спородохиях, а также хламидоспоры. Включают виды со стерильным мицелием.

3. Coelomycetes — образуют конидии в спородохиях и спороложах (в прежнем понимании — Sphaeropsidales и Acervulales).

Диагностика несовершенных грибов базируется на особенностях морфологии специализированных органов бесполого размножения, которая является одним из ведущих признаков, учитывающих амплитуду ее изменчивости, т. е. на морфологии конидиеносцев и способе образования конидий [51, 53, 55, 245, 354, 490, 491, 508, 547, 602, 624].

1.3.3.2. ОРГАНЫ РАЗМНОЖЕНИЯ

Конидиеносцы — это структуры, которые служат для прикрепления спор, образующихся из вегетативного мицелия и стромы. Это обособленные ответвления гиф, которые у многих видов имеют сложную структуру, обеспечивающую обильное конидиеобразование. Они или отчетливо обособлены от вегетативных гиф и малоотличимы, или почти не отличаются от них и могут состоять из одиночной гифы (ветвящейся или нет) или гиф, собранных в пучки (коремии).

Различают конидиеносные клетки двух типов: *бластические*, развивающиеся из части конидиогенной клетки, зачаток конидий у которых заметно увеличивается еще до образования поперечной перегородки, отделяющей конидию от конидиогенной клетки, и *таллические*, которые развиваются из всей конидиогенной клетки. Бластические конидии образуются *голобластически* — все слои оболочки конидиеобразующей клетки принимают участие в образовании оболочки конидий, или *энтеробластически* — наружные слои оболочки конидиогенной клетки не принимают участия в образовании оболочки конидий. При этом различают два способа образования конидий: *третический*, при котором отпочковывание конидий происходит через канал (пору) в оболочке конидиогенной клетки; *фиалидный* — конидии образуются в фиалидах. Детерминированные конидиеносные клетки (бластические и таллические) прекращают рост до стадии образования следующих конидий (рис. 30).

Фиалида — конечная спороносящая клетка сложного конидиеносца, обычно бутылковидной формы, образующая на конце одиночную конидию либо в базипетальной последовательности цепочку или головку конидий (рис. 31). Верхушечные клетки ответвлений конидиеносца, несущие конидии, имеют характерную, часто бутылковидную, веретеновидную или шаровидную форму и тоже называются фиалидами.

Конидиеносцы бывают простые и сложные. У простых конидии образуются на верхушке конидиеносца или его ответвлений (рис. 32). При моноподиальном ветвлении конидиеносцев боковые ответвления отходят от центральной оси, при симподиальном — центральная ось прекращает рост, а боковая веточка служит как бы продолжением центральной оси; от этой боковой веточки отходит боковая веточка

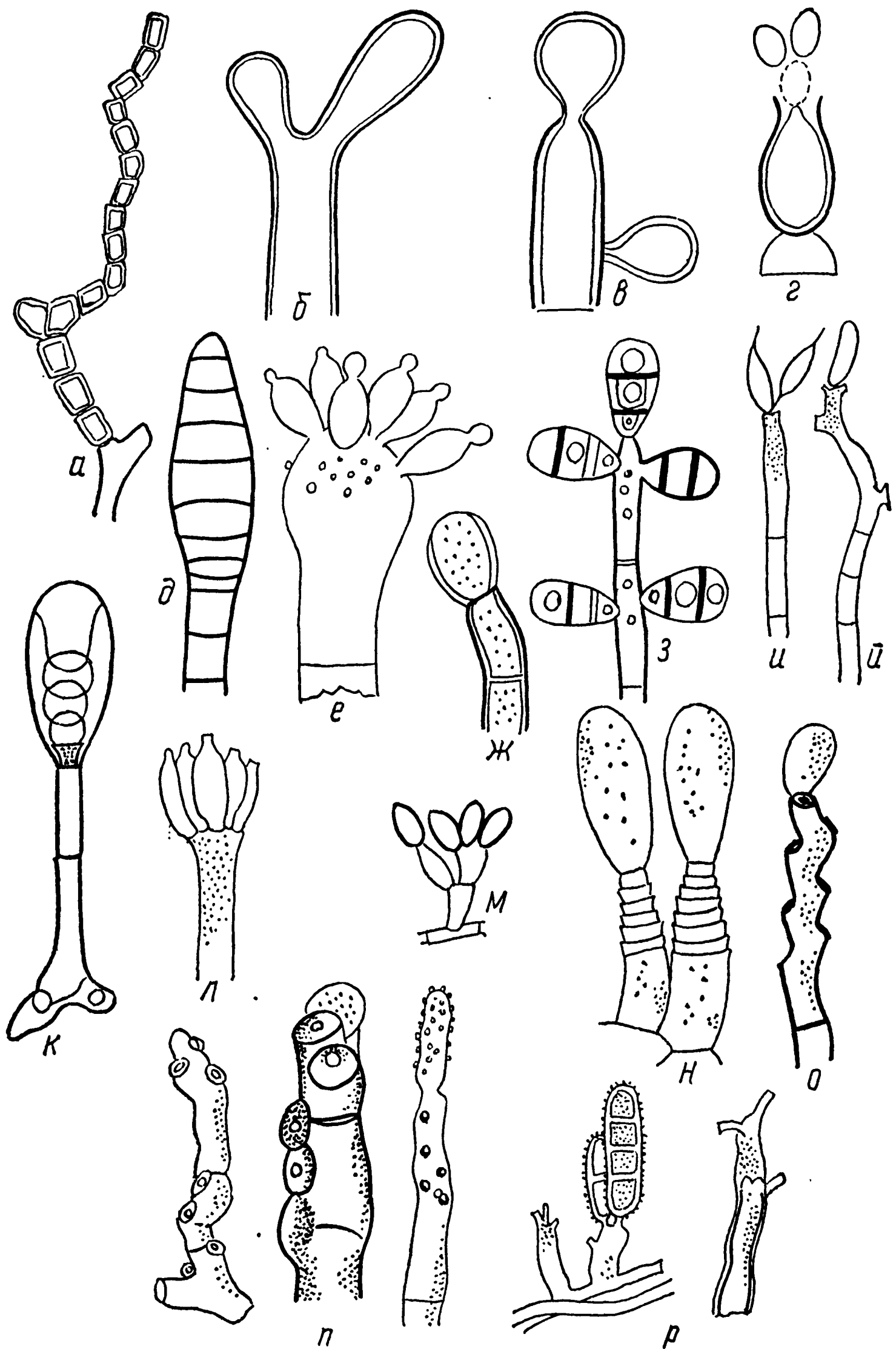


Рис. 30. Конидиеносные клетки:

а — таллические; *б—г* — бластические; *ж, з* — пороспоровые; *и, й* — фиалидные; *к* — интегрированные; *л* — раздельные; *м* — детерминированные; *н* — простирающиеся от основания к вершине; *о* — симподиальные; *п* — рубцевидные; *р* — мелкозубчатые.

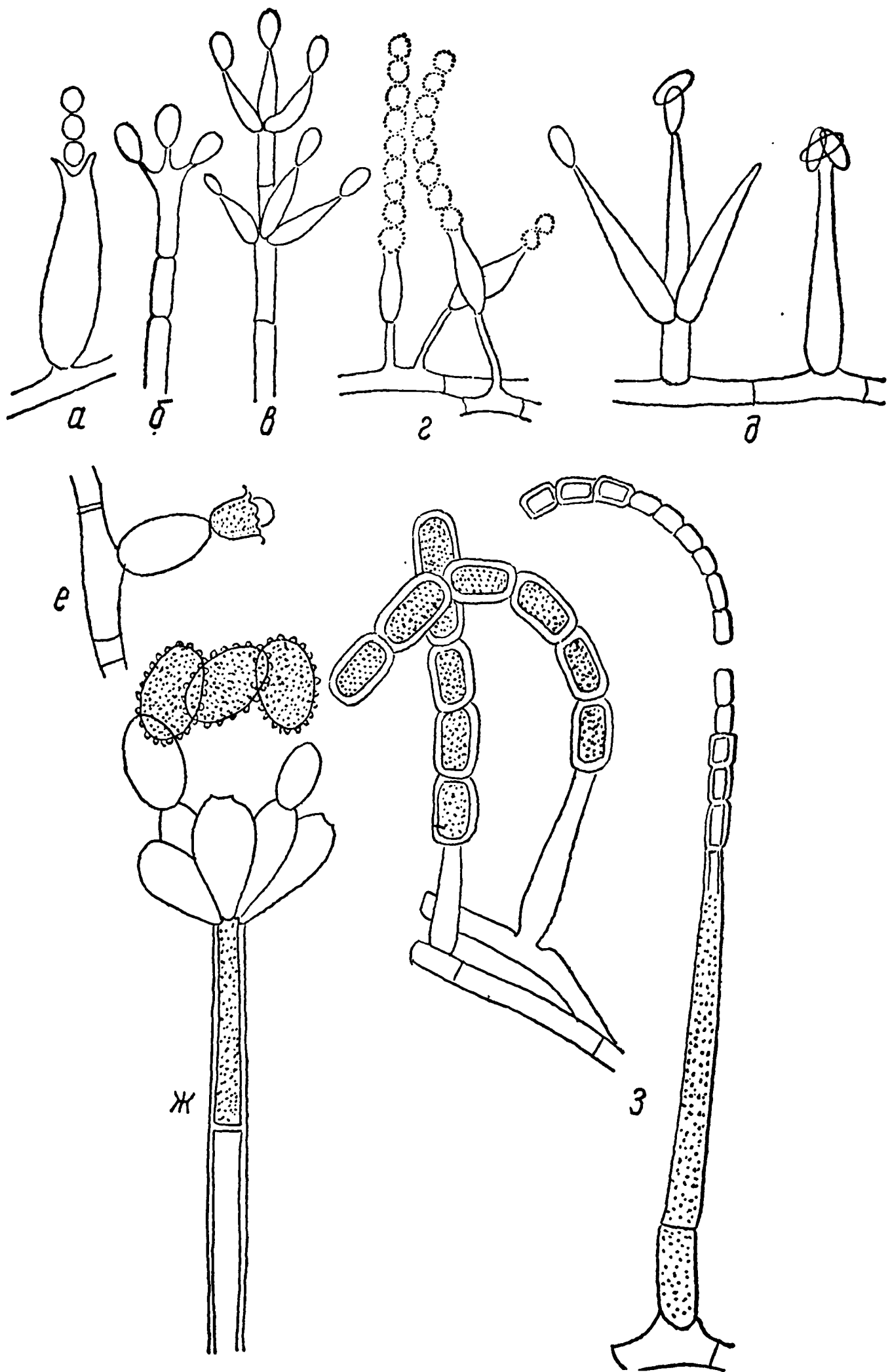


Рис. 31. Строение фиалид:

a — *Phialophora*; *б* — *Tubercularia*; *в* — *Trichoderma*; *г* — *Torulomyces lagena*; *д* — *Verticillium lateritium*; *е* — *Phialophora verrucosa*; *ж* — *Stachybotrys*; *з* — *Thielaviopsis*.

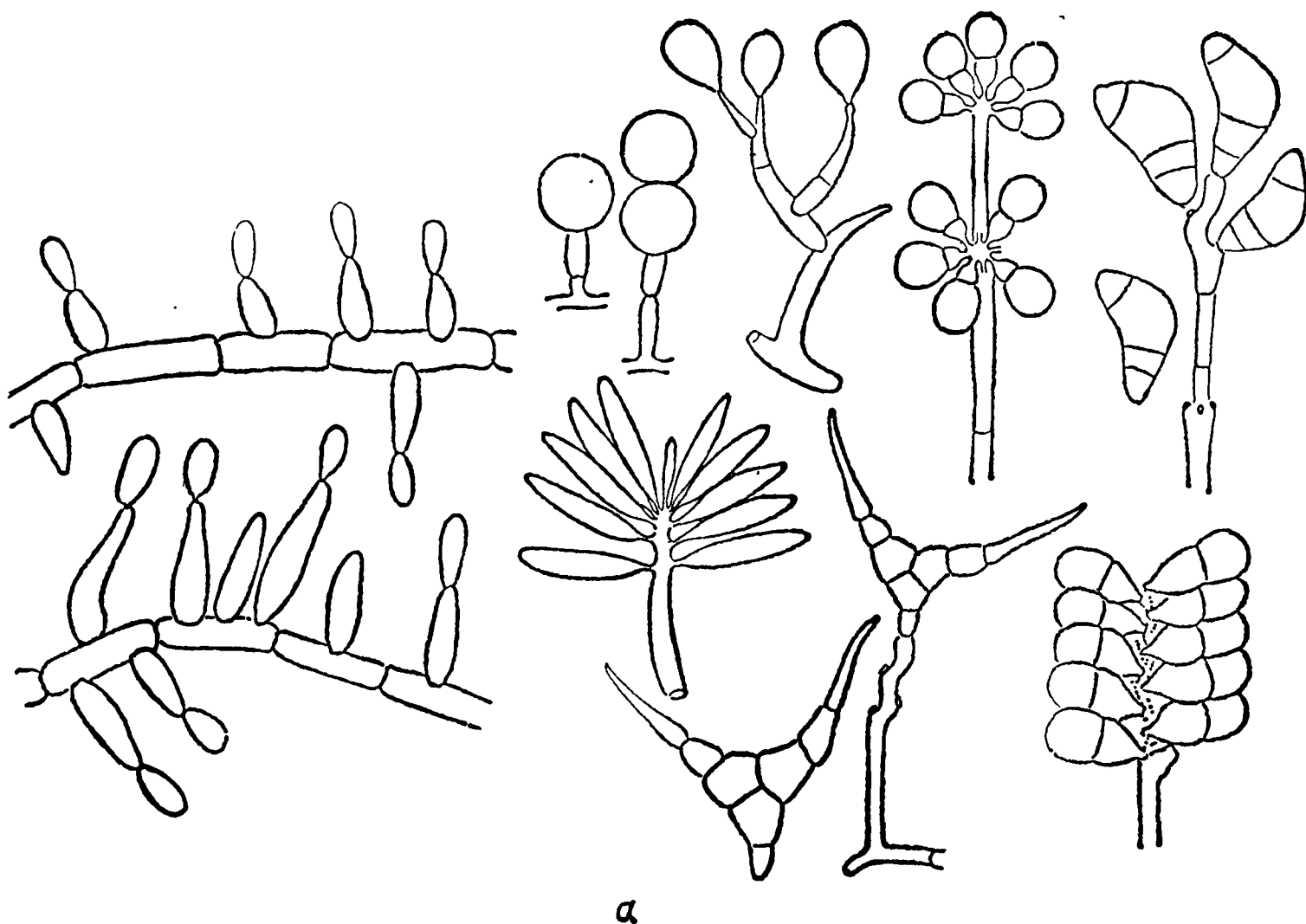
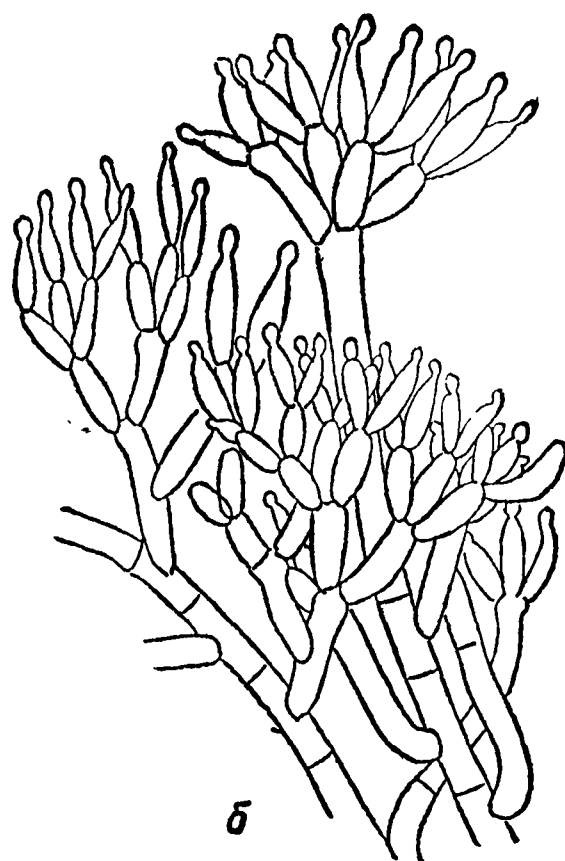


Рис. 32. Конидиеносцы:
а — простые; б — разветвленные.

следующего порядка, как бы продолжая центральную ось и т. д. При дихотомическом ветвлении конидиеносец в точке роста образует несколько последовательных вилкообразных разветвлений (рис. 33). Сложные конидиеносцы характеризуются различными разветвлениями или наличием верхушечного вздутия (головки), на поверхности которых возникают фиалиды (первого и второго порядков), несущие конидии.

У видов рода *Aspergillus* фиалиды расположены не на ответвлениях конидиеносца, а на головке, составляя сплошной слой, часто покрывающий всю поверхность вздутия. Конидиальные головки могут иметь шаровидную, булавовидную и цилиндрически-булавовидную формы. У некоторых видов этого рода (*Asp. ochraceus* и др.) фиалиды двуярусные. Нижняя клетка двуярусной фиалиды расположена непосредственно на вздутии и несет несколько фиалид второго яруса, собранных в пучок (рис. 34).

Конидиеносцы могут иметь вид кисточек с веточками первого, второго, иногда третьего порядков, на которых образуется по несколько фиалид. На вершине их образуются конидии в цепочках. У видов рода



Penicillium кисточки отходят, как веточки вегетативного мицелия, часто почти перпендикулярно к гифам и по характеру ветвления разделяются на симметрические и несимметрические.

Одноярусные кисточки (одномутовчатые, моновертициллярные) состоят из одной мутовки фиалид, расположенных на вершшке конидиеносца, который под самой мутовкой фиалид иногда слегка расширяется.

Двухъярусные кисточки (двумутовчатые, бивертициллярные) состоят из мутовок фиалид, расположенных на цилиндрических ответвлениях — метулях, расположенных также мутовкой на вершшке ножки конидиеносца.

Многоярусные кисточки (многомутовчатые, поливертициллярные) состоят из метуль, которые расположены мутовками на мутовчато расположенных ответвлениях конидиеносца, а не непосредственно на ножке конидиеносца, как у двухъярусных. Такие кисточки состоят из нескольких ярусов: веточек, метуль, фиалид.

У несимметричных кисточек мутовки метуль расположены на вершшке односторонне отходящих веточек конидиеносца — обычно одной центральной и одной боковой (рис. 35). У одних видов дейтеромицетов конидиеносцы образуются на гифах одиночно, у других — скученно, сплошным слоем в виде спородохий, пионнот и пикнид.

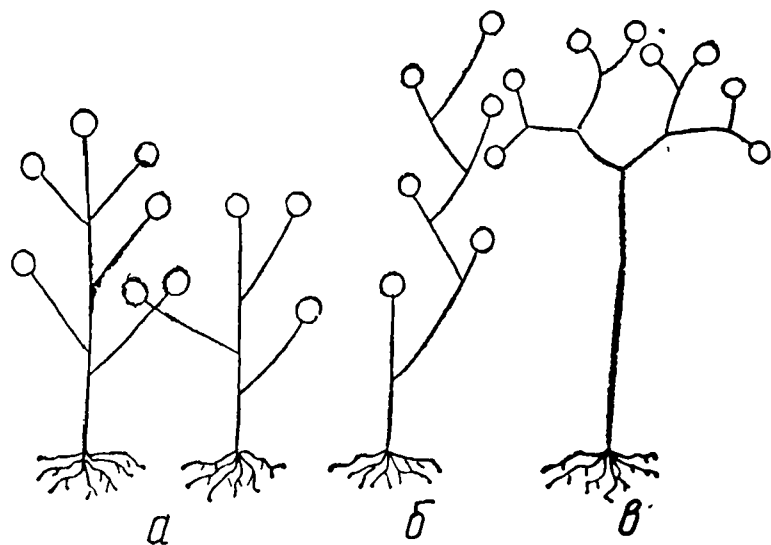


Рис. 33. Типы ветвления конидиеносцев:

a — моноподиальное; *б* — симподиальное; *в* — дихотомическое.

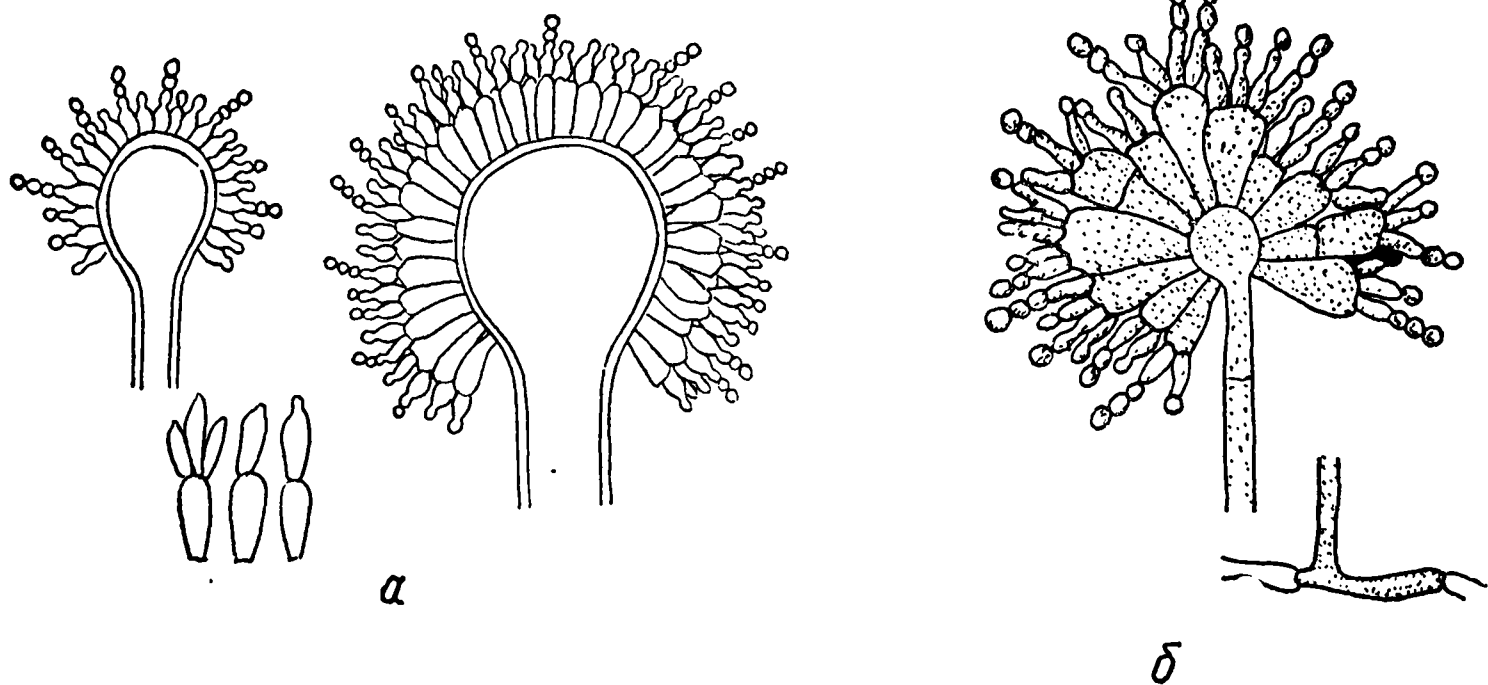


Рис. 34. Варианты строения головки конидиеносцев *Aspergillus*:
a — одноярусные; *б* — двухъярусные фиалиды.

Спородохии — отдельные плотные скопления коротких конидиеносцев, часто разветвленных, возникающие одновременно на прозоили плектенхиматическом сплетении мицелия (рис. 36, *a*).

Пионноты — сплошной слой спородохий на поверхности мицелия (сливающиеся спородохии). В спородохиях и пионнотах образуются обычно однотипные конидии, покрытые слизью (рис. 36, *б*).

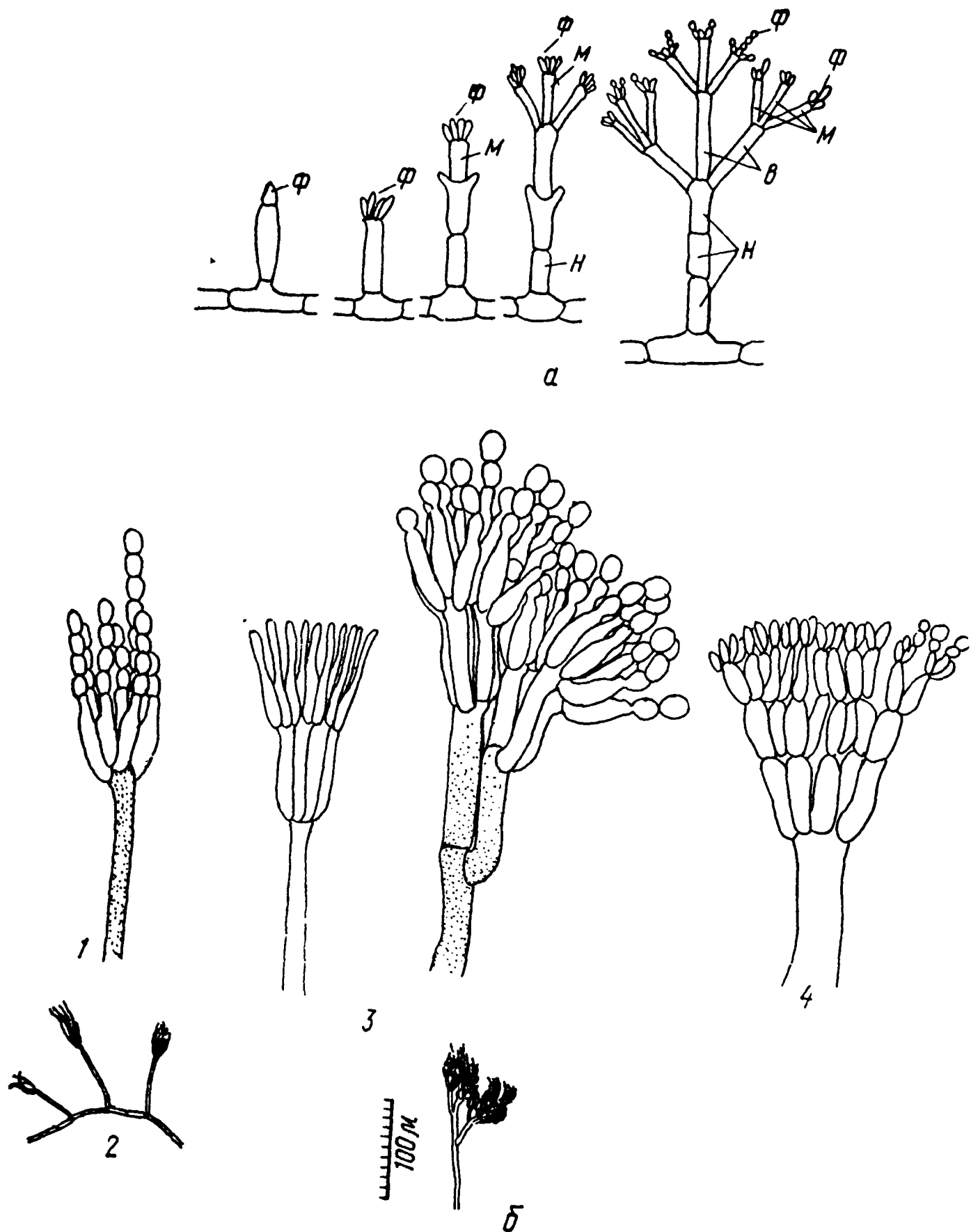


Рис. 35. Схема развития конидиеносцев у *Penicillium* (а):

Ф — фиалиды; М — метули; В — веточки; Н — ножка.

Типы конидиеносцев (б):

1 — одномутовчатые моновертициллатные; 2 — двумутовчатые бивертициллатные; 3 — многомутовчатые асимметрические; 4 — поливертициллатные.

Пикнида — особое тело, внутри которого находится тесное скопление коротких простых или разветвленных конидиеносцев. Пикнида покрыта оболочкой, представляющей прозо- и плектенхиматическое сплетение гиф, называемой *перидием*.

Пикниды чаще всего имеют шаровидную форму и узкое отверстие наверху — устье, которое иногда вытянуто в сосочек или удлиненный хоботок. Пикноспоры, или стилоспоры, образуемые внутри, обычно покрыты слизью и выходят через устье. Внутри пикниды конидиеносцы отходят радиально от перидия или расположены ближе к основанию (рис. 36, в).

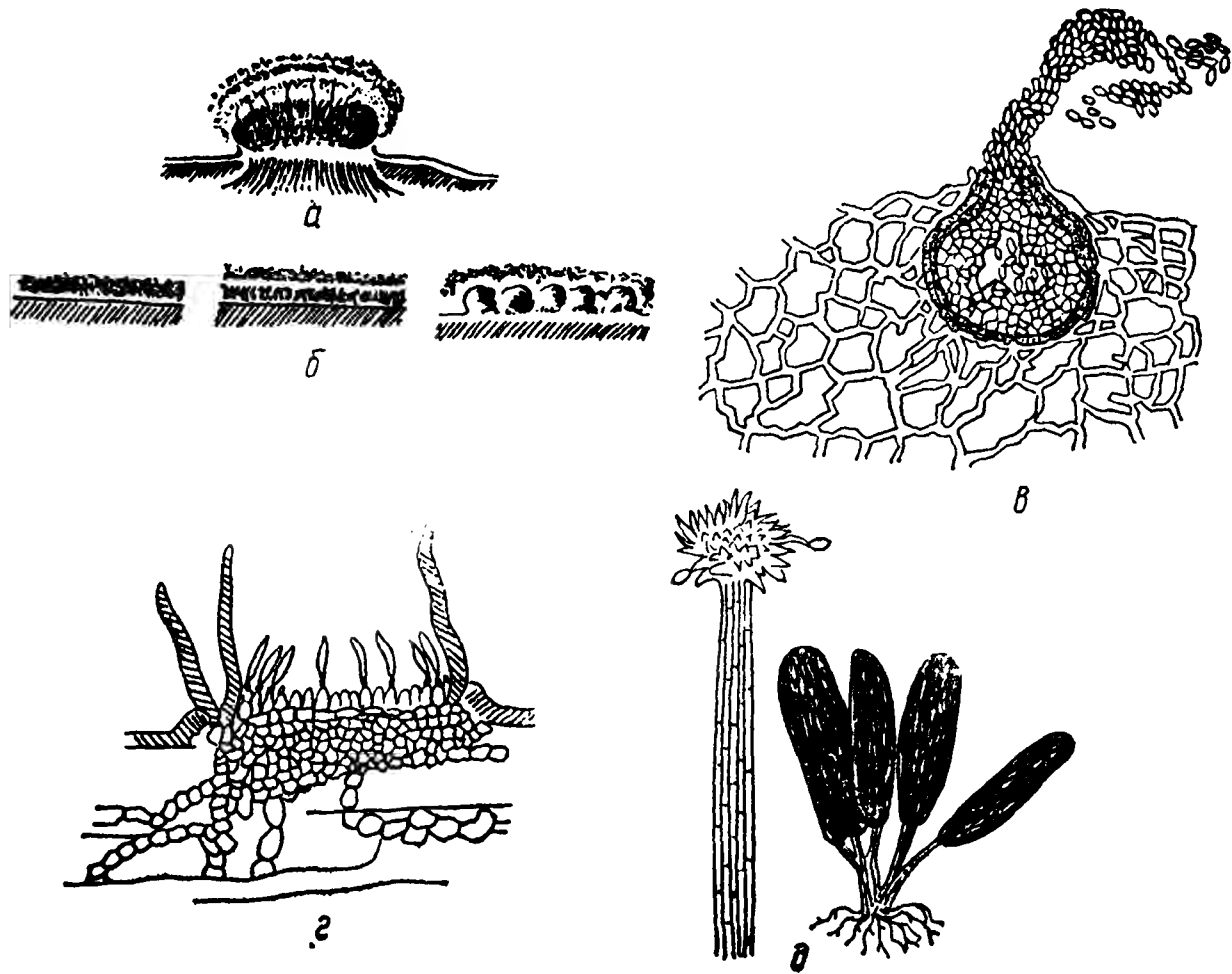


Рис. 36. Виды скоплений конидиеносцев:

а — спородохий; б — пионнот; в — пикнида; г — спороложе; д — коремий.

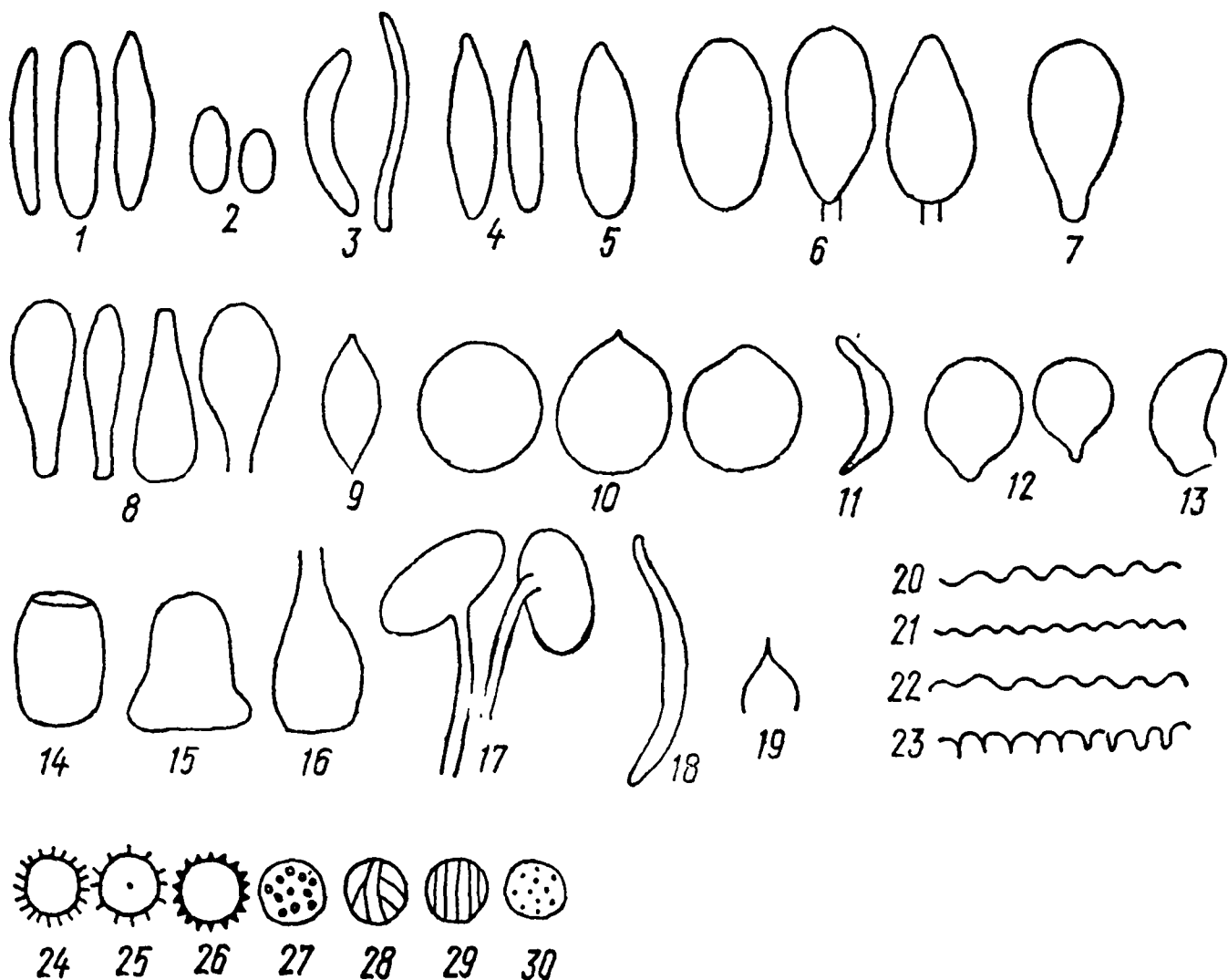


Рис. 37. Форма конидий:

1 — цилиндрическая; 2 — овальная; 3 — угревидная; 4 — веретеновидная; 5 — эллиптическая; 6 — яйцевидная; 7 — грушевидная; 8 — булавовидная; 9 — лимоновидная; 10 — шаровидная; 11, 12 — серповидная; 13 — реповидная; 14 — почковидная; 15 — бочонковидная; 16 — колоколообразная; 17 — бутылковидная; 18 — щитовидная; 19 — коническая.

Структура оболочки:

20—22 — мелкозубчатая; 23 — шиповатая; 24 — бородавчатая; 25 — мелкоигльчатая; 26 — мелкошиповатая; 27 — очаговая (фокальная); 28 — с мелкими извилистыми канальцами; 29 — с узкими бороздками; 30 — пятнистая с просвечивающими точками.

Спороложе — плоское сплетение гиф, на поверхности которого тесным слоем располагаются конидиеносцы, большей частью короткие, мало или совсем не ветвящиеся. Конидии образуются на кончиках свободных гиф (рис. 36, г).

Коремии — конидиеносцы, соединенные в вертикально расположенные или тесно сросшиеся пучки (часто вместе со стерильными гифами) (рис. 36, д). Конидии образуются на верхушке конидиеносца или их ответвлений на всей поверхности коремиев или только у вершины их, иногда скопляясь в виде головки. Характерны для группы грибов *Coremiales*.

1.3.3.3. КОНИДИИ

Конидии — споры бесполого размножения экзогенного происхождения. Возникают на конидиеносцах (на верхушке, по бокам, вдоль всей продольной оси, на выступах, зубчиках, ответвлениях) или же

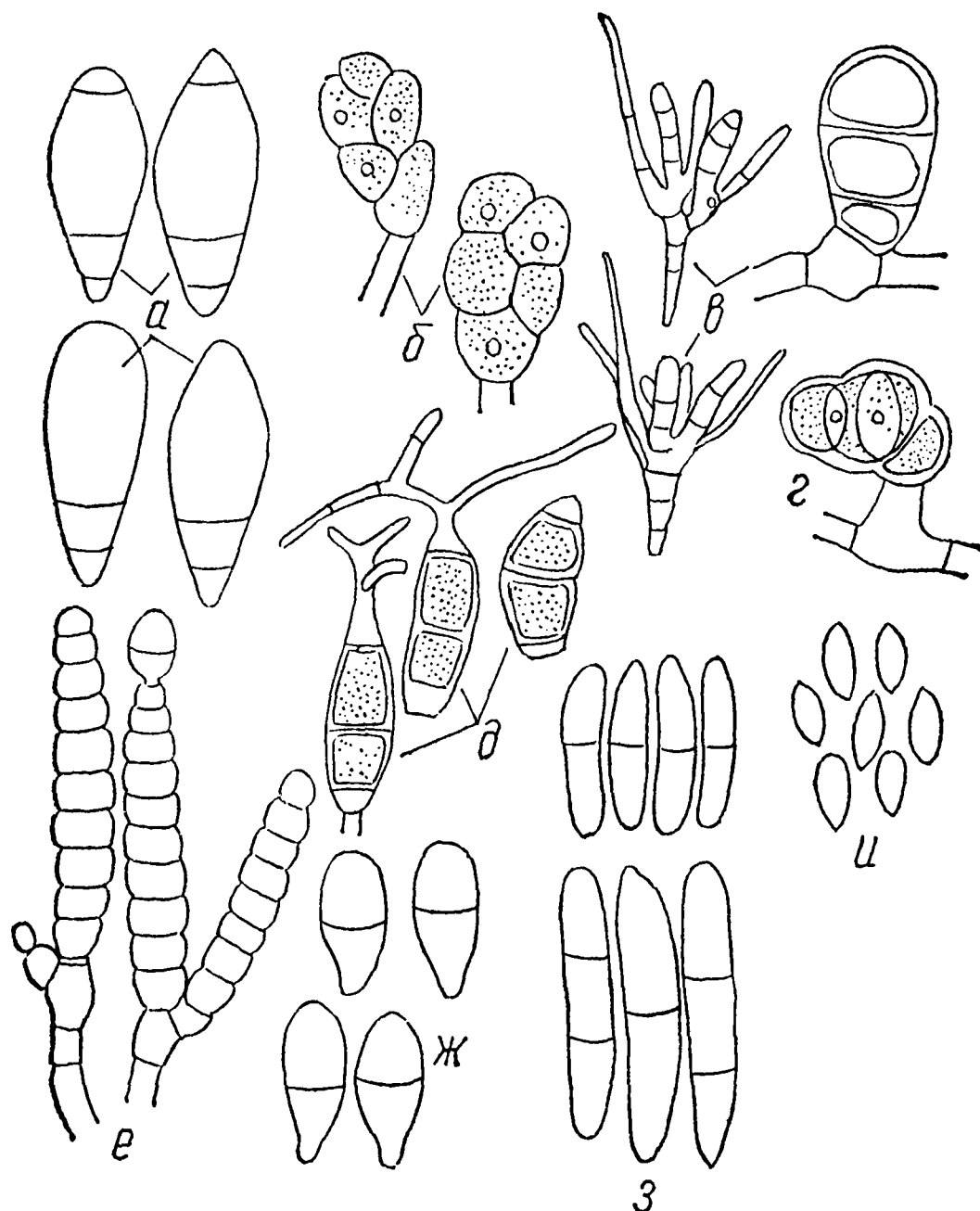


Рис. 38. Конидии:

a — *Monacrosporium psychrophilum*; *б* — *Monodictis levis*; *в* — *Tetracladium setigenum*; *г* — *Trichocladium opacum*; *д* — *Pestalotia truncata* (*Truncatella truncata*); *е* — *Dendryphion nanum*; *ж* — *Trichothecium roseum*; *з* — *Cylindrocarpon*; *и* — *Hyalobotrys elegans*.

на особых коротких веточках — фиалидах. Молодые конидии имеют вид небольшого вздутия, которое после деления ядра отделяется перегородкой от конидиеносца и, продолжая рост, принимает форму, характерную для данного вида гриба (иногда делится перегородками на несколько клеток). Форма конидий и их оболочка весьма разнообраз-

разны (рис. 37, 38). Они бесцветные или же в массе различно окрашенные. У многих грибов конидии образуются на конидиеносце и его ответвлениях последовательно одна за другой. При этом ранее образовавшиеся конидии в одних случаях отходят в сторону и собираются в головку (ложную), в других — остаются на новообразующихся конидиях и по мере образования последних составляют цепочку.

Различают два способа образования конидий в цепочках: акропетальный и базипетальный. При *акропетальном* способе более старая

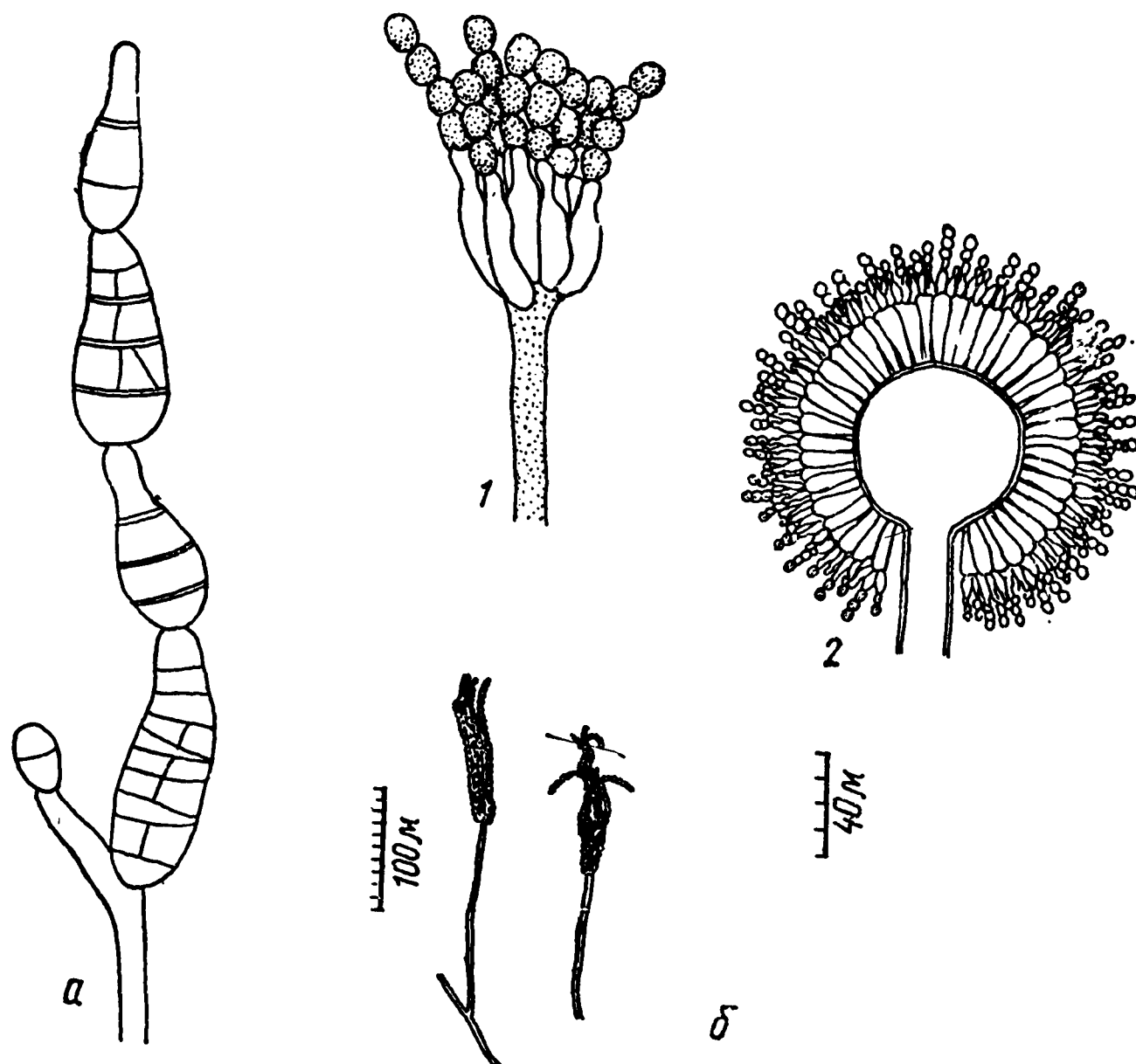


Рис. 39. Способы образования конидий в цепочках:

а — акропетальный (тип *Alternaria*); *б* — базипетальный (1 — тип *Penicillium*, 2 — тип *Aspergillus*).

конидия располагается у вершины конидиеносца, т. е. у основания цепочки, и от нее отпочковывается вторая, более молодая, от второй — третья и т. д. В цепочках данного типа наиболее молодая конидия — верхняя (тип *Alternaria*). При *базипетальном* способе конидиеносец образует под более старой конидией молодую, а под ней — следующую. В этом случае более старые конидии находятся у вершины цепочки, более молодые — у основания (тип *Penicillium*, *Aspergillus*) (рис. 39).

Некоторые грибы, такие, как *Fusarium*, *Microsporium* и др., образуют споры двух типов, отличающиеся размерами: макроконидии — крупные многосептированные споры и микроконидии — мелкие, несептированные.

Макроконидии видов рода *Fusarium* обычно серповидные, веретеновидно-серповидные, реже веретеновидно-ланцетовидные с различным характером и степенью изогнутости. Из элементов морфологии макроконидий диагностическое значение имеют их размеры, характер

изогнутости, форма верхней клетки, наличие ножки у основания, количество перегородок.

Изогнутость конидий: эллиптическая — почти равномерная и незначительная на обоих концах; параболическая — конидии изогнуты преимущественно в верхней части; гиперболическая — значительная

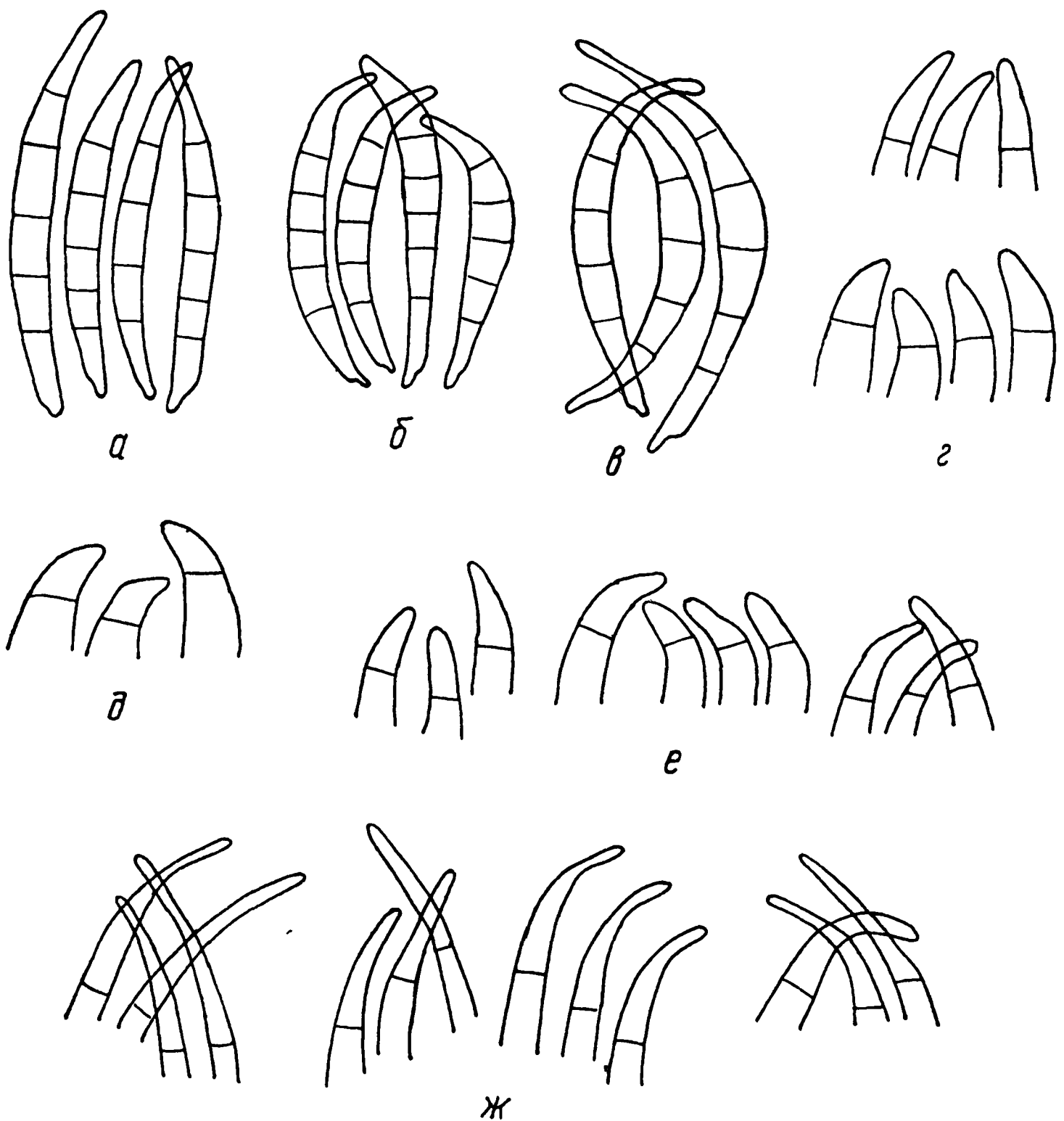


Рис. 40. Форма макрокониций рода *Fusarium*:

а — эллиптическая; *б* — параболическая; *в* — гиперболическая.

Форма верхней клетки:

г — слегка суженная; *д* — внезапно суженная короткая коническая; *е* — сильно и резко суженная удлиненная; *ж* — сильно и постепенно суженная нитевидно удлиненная.

на обоих концах. Кроме этих типов изогнутости для некоторых видов характерны угревидная изогнутость, звездчатость и др.

Форма верхней клетки. Для большинства видов характерна постепенно и равномерно суженная (коническая) верхняя клетка. У некоторых видов встречаются иные формы: 1) слегка суженная, тупая, изогнутая или прямая; 2) слегка и внезапно суженная короткая; 3) слегка суженная удлиненная и усеченная; 4) сильно и резко суженная удлиненная; 5) сильно и резко суженная, нитевидно удлиненная, иногда загнутая (рис. 40).

Ножка у основания макроконидий большинства видов четко выражена; у ряда видов она имеет вид сосочка или нечетко выражена, у некоторых видов — отсутствует.

Количество перегородок в макроконидиях отдельных видов обычно достигает 3—5, реже 5—7.

Размер макроконидий и количество перегородок, с учетом амплитуды их изменчивости, являются важными признаками выделения отдельных видов и разновидностей. Для некоторых видов характерно изменение толщины макроконидий посередине и у концов.

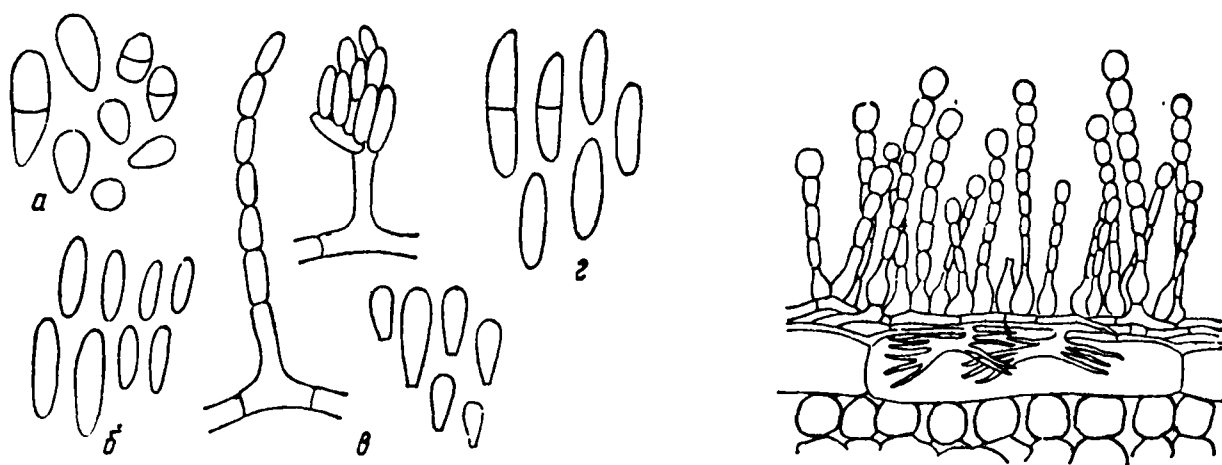


Рис. 41. Микроконидии видов рода *Fusarium*:

a — *F. sporotrichiella*; *б* — *F. oxysporum*; *в* — *F. moniliforme*; *г* — *F. solani*.

Рис. 42. Эндоконидии.

Микроконидии в морфологическом отношении менее дифференцированы, чем макроконидии, но они играют значительную роль в распространении вида и заселении субстрата. Их наличие или отсутствие может быть использовано для диагностики отдельных видов только в случае их обильного и относительно постоянного образования. По форме различают микроконидии овально-цилиндрические, эллипсоидальные, яйцевидные с почти равным диаметром на протяжении всей длины, с округленными концами, с широкой амплитудой соотношений длины и ширины; обратнобулавовидные с расширенной верхушкой и суженным основанием (рис. 41).

Для дейтеромицетов характерно образование *эндоконидий* путем деления цитоплазматического содержимого прямых неветвящихся конидиеносцев на отдельные клетки, обособленные внутренним слоем оболочки. При этом наружный слой оболочки конидиеносца отслаивается в виде чехла, из которого конидия постепенно выталкивается (рис. 42).

1.3.3.4. ОНТОГЕНЕЗ КОНИДИЙ

В настоящее время для построения классификационных схем используют онтогенетические исследования спороношений, особенно некоторых представителей гифомицетов.

По способу образования у гифальных выделяют следующие типы спор:

Бластоспоры — споры, образуемые по типу почек на поверхности спорогенной клетки прямо на гифе или на коротких зубчатых отростках. Конидиеносец при этом удлиненный или апикально утолщенный и покрыт зубчиками. Бластоспоры отделяются от спороносной клетки в результате сжатия небольшого канала между спорогенной клеткой и конидией при наполнении его веществом клеточной оболочки (типы

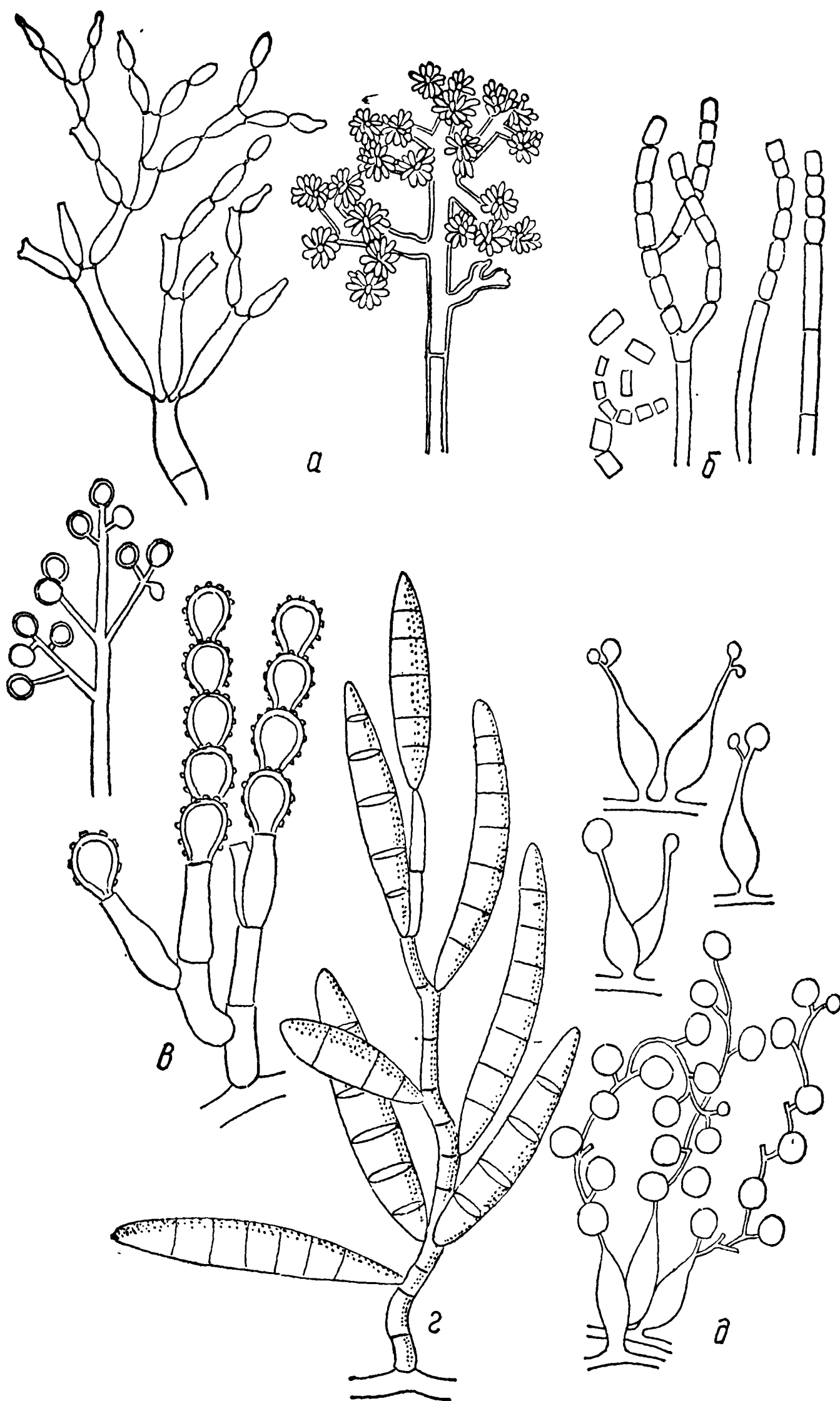


Рис. 43. Типы образования конидий у гифомицетов:
 а — бластоспоры (*Cladosporium*); б — артроспоры (*Geotrichum*); в — алеуроспоры (*Scopulariopsis*); г — пороспоры (*Helminthosporium*); д — радуласпоры (*Beauveria*).

Cladosporium, *Bispora*, *Monilia*). Бластоспоры могут продуцировать новые бластоспоры на апексах, формируя акропетальные простые или разветвленные цепочки конидий.

Фиалоспоры развиваются на специальных образованиях конидиеносцев — фиалидах (типы *Penicillium*, *Aspergillus*), как правило, эндогенно внутри фиалиды или на апексе. В конечном итоге тонкостенные апикальные головки фиалид разрываются под тургорным давлением (*Thielaviopsis basicola*). У *Phialophora* первые фиалоспоры располагаются внутри неразорванных фиалид и являются эндогенными, тогда как последующие фиалоспоры экзогенные, даже если они погружены внутрь открытого устья. Край оболочки фиалиды при растяжении образует выступ или воротничок, который у одних видов значительный и сильно выступающий, а у других очень маленький и почти неразличимый.

Различают би- и полифиалиды. Бифиалиды имеют двойную верхушку, окруженную небольшим воротничком, и две споры могут образовываться одновременно (тип *Gonytrichum*). Полифиалиды образуют фиалоспору базипетально (тип *Catenularia*). Фиалоспоры обычно собираются в ложные головки или цепочки.

Артроспоры образуются в результате деления спорогенной гифы конидиеносцев с образованием одиночных спор или их ветвящихся цепочек. Такие споры могут также возникать эндогенно внутри спорогенной гифы. Артроспоры освобождаются путем гистолизиса или расщепления (разрыва) внешней оболочки спорогенной гифы (типы *Geotrichum* (экзогенный), *Thielaviopsis* (эндогенный)).

Алеуроспоры, или хламидоспоры, возникают как терминальные, боковые или интеркалярные выпячивания конидиеносцев или гиф и отделяются от материнской клетки одной или двумя перегородками. Они в основном устойчивы и функционируют как покоящиеся споры (тип *Trichocladium asperum*).

Пороспоры образуются одиночно или группами, имеют толстую оболочку и развиваются через мелкие одиночные или многочисленные поры в стенках спороносца (типы *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*).

Радуласпоры развиваются на маленьких стеригмах, образуемых на кончике конидиеносца или же на интеркалярных вздутиях (тип *Beauveria*) (рис. 43).

Классификации, основанные на типах спорогенеза, объединяют гифомицетальные грибы в более естественные группы, чем классификации, основанные только на морфологии конидий. Однако они не вполне отражают естественную эволюцию грибов. Основным недостатком этих классификаций является пока ограниченное число изученных видов грибов и трудности, связанные с распознаванием типов конидий, требующих от исследователя специальных знаний.

1.3.3.5. ПИГМЕНТАЦИЯ КОНИДИЙ И КОНИДИЕНОСЦЕВ

Большое значение для диагностики дейтеромицетов имеет пигментация конидий и конидиеносцев. Так, разделение дейтеромицетов по Саккардо на два семейства *Moniliaceae* и *Dematiaceae* основывается на этом признаке. Бесцветные или слегка окрашенные конидии и конидиеносцы являются признаком семейства *Moniliaceae*, хотя этот критерий не стабилен, поскольку зрелые колонии и конидии могут быть темно-коричневыми и на этом основании их можно легко отнести к семейству *Dematiaceae*.

1.3.3.6. МИЦЕЛИЙ

Мицелий дейтеромицетов представляет собой сложную систему гиф с выраженной дифференциацией, проявляемой у разных видов в неодинаковой степени. Мицелий, состоящий из гиф, снабженных перегородками, называется многоклеточным или членистым, а из гиф, лишенных перегородок, — нечленистым или одноклеточным.

Различают мицелий погруженный, или субстратный, который развивается внутри субстрата или питательной среды, и воздушный, или поверхностный, развивающийся на поверхности субстрата. У многих грибов наблюдается образование ложной ткани, из которой состоят

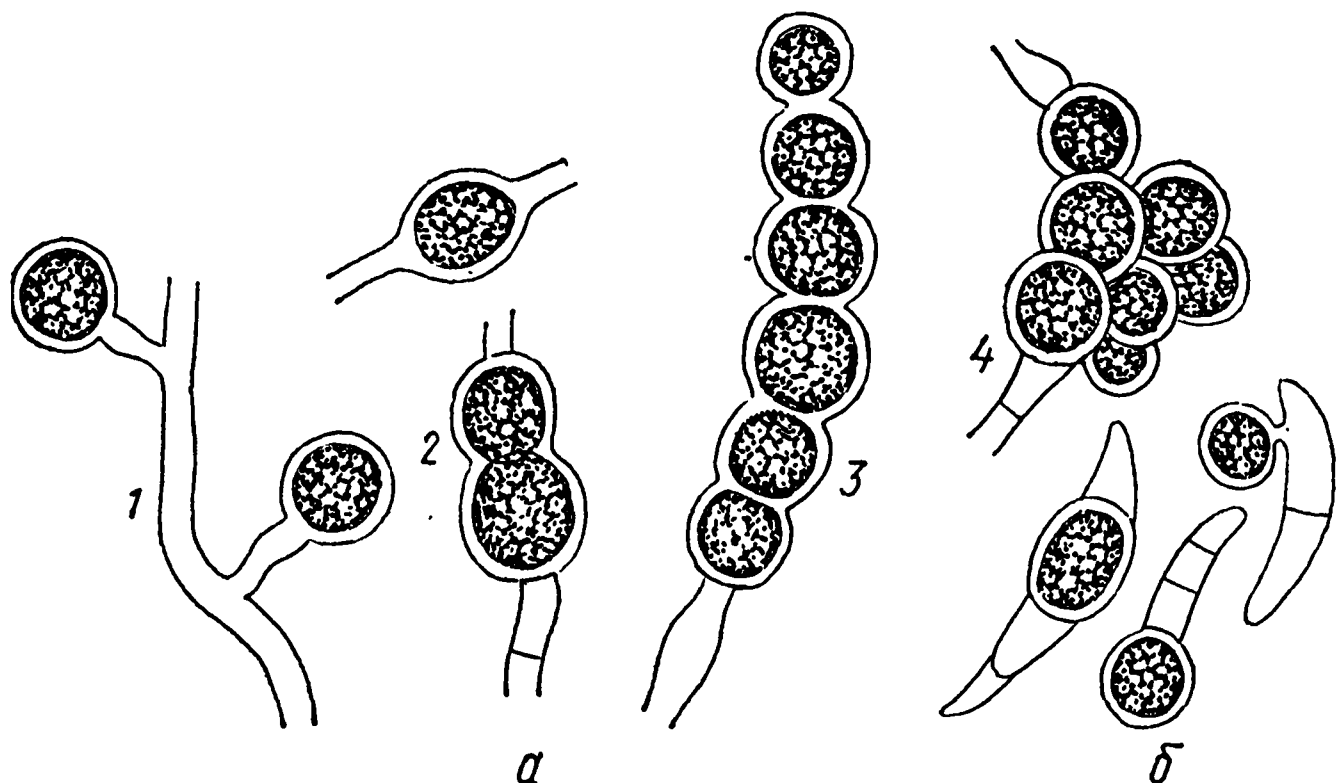


Рис. 44. Типы хламидоспор:

а — мицелиальные: 1 — терминальные (верхушечные); 2 — интеркалярные (промежуточные); 3 — в цепочках; 4 — в клубочках; *б* — конидиальные.

плодовые тела, склероции, тяжи и т. п., она образуется путем более или менее плотного сплетения гиф и называется *псевдопаренхимой*, или *плектенхимой*. Если в плектенхиме сохраняется нитевидная форма гифальных клеток, то она называется *прозоплектенхимой*; если же плектенхима состоит из клеток более или менее равного диаметра (длина не более чем в 2 раза превышает ширину), то она называется *параплектенхимой*. У грибов известны такие видоизменения мицелия, как хламидоспоры, мицелиальные тяжи, склероции, микросклероции, ризоморфы, кольца и др.

Распространение гриба в субстрате, передвижение по гифам питательных веществ к месту образования органов спороношения, выживаемость при неблагоприятных условиях обеспечивается мицелиальными тяжами. Это линейно агрегированные гифы (от нескольких гиф до тяжей диаметром несколько миллиметров), образованные из вегетативного мицелия, которые могут неограниченно распространяться в длину. Часто наблюдаются у видов родов *Penicillium*, *Raesiomyces*. Тяжи, которые агрегируются вокруг центральной гифы, называются мицелиальными, а более сложные, развивающиеся из концов гиф (до несколько сот), называются ризоморфами.

Хламидоспоры — крупные клетки с утолщенной оболочкой. Имеют шаровидную или широкоовальную форму, размеры в среднем дости-

гают 12×12 мкм (рис. 44). Располагаются в виде клубочков или цепочек. Оболочка хламидоспор многослойная, иногда двойная, гладкая, шиповатая или мелкобугорчатая. Одни хламидоспоры имеют фиброзный наружный слой, другие — лишены его. В зрелых хламидоспорах толщина оболочки достигает 0,50—0,55 мкм. Цитоплазма их содержит жировые включения, число и размер которых варьируют в зависимости от возраста культуры. Образование этих включений зависит от условий среды и качественных изменений субстрата, возникающих в процессе жизнедеятельности. У многих видов грибов образуются фрагменты гиф с увеличенными клетками хламидоспорового типа с утолщенной оболочкой. Хламидоспоры служат для сохранения вида в неблагоприятных условиях. Особенно это относится к паразитным грибам. Характерное отличие хламидоспор от остальных клеток мицелия — их многоядерность, хотя количество ядер не является постоянным признаком и варьирует даже в пределах вида.

Склероции представляют собой агрегацию септированных гиф грибов в виде особых тел сферической или неправильной формы. Наружный слой их часто темноокрашенный вследствие утолщения и меланизации оболочки, а внутренний состоит из рыхлой, обычно неокрашенной ткани. Размеры склероциев колеблются у разных видов от нескольких миллиметров до нескольких десятков сантиметров. Образуются они в основном на мицелии, а у ряда паразитных грибов — внутри пораженного растения. Склероции устойчивы к действию неблагоприятных факторов и могут сохранять жизнеспособность длительное время. Различают два типа склероциев: терминальные — на концах гиф и интеркалярные — в отдельных фрагментах главных гиф (рис. 45).

Микросклероции — структуры с менее выраженной дифференциацией клеток гиф мицелия. Образуются на концах гиф путем их повторного дихотомического ветвления, образования перегородок и трех слоев — кожуры, корковой паренхимы и сплетений гиф, расположенных между ними (например, *Botrytis cinerea*). Размер склероциев увеличивается в результате усиленного роста, образования перегородок и последующей дифференциации клеток в отдельных слоях склероция. Зрелые склероции содержат меньше влаги по сравнению с мицелием и много запасных веществ — липидов, гликогена.

1.3.3.7. КОЛОНИЯ

Дифференцированный в определенной степени мицелий, отличающийся отдельными элементами даже в пределах вида. Это форма верхушечного роста главной гифы и ее многочисленных ответвлений, которые могут распространяться от центра материнской (исходной, посевной) клетки, образуя субстратный и воздушный мицелий. Колонии растут радиально от центра посева исходной культуры путем удлинения и ветвления гиф.

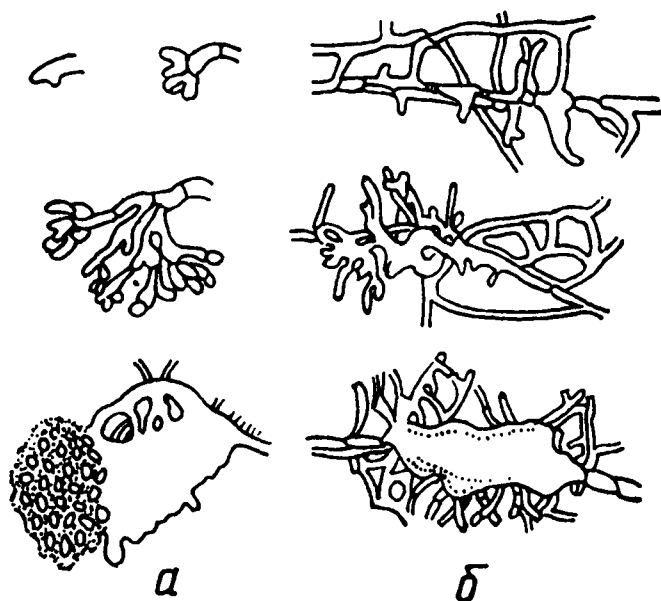


Рис. 45. Типы склероциев:

a — терминальный (*Botrytis allii*);
б — интеркалярный (тяжистый) (*Sclerotinia gladioli*).

II. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГРИБОВ

Микроскопическое изучение грибов проводят с целью их идентификации, установления специфики строения и развития, а также некоторых цитохимических и физиологических особенностей.

II.1. СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

II.1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Световая микроскопия основана на принципе создания увеличенного изображения изучаемого объекта при прохождении световых лучей от искусственного или естественного источника освещения через оптическую систему микроскопа. Световая микроскопия позволяет исследовать объект на клеточном уровне.

II.1.2. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ

В настоящее время в лабораторной практике применяют микроскопы типа МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6 и др.* [288, 388, 389]. Общее увеличение, которое может дать микроскоп, определяют, умножая увеличение объектива на увеличение окуляра. Ценность микроскопа определяется, однако, разрешающей способностью, под которой понимают способность оптической системы воспроизводить в виде двух точек две расположенные в непосредственной близости точки исследуемого объекта. Чем это расстояние меньше, тем больше разрешающая способность микроскопа. Подбирая оптимальные условия для изучения объекта, следует обращать внимание на разрешающую способность микроскопа и комбинированием объективов и окуляров находить наилучшую. Например, при увеличении объектива 40 и окуляра 25 увеличение микроскопа составляет 1000, а его разрешающая способность 0,9; при увеличении объектива 90 и окуляра 10 увеличение микроскопа меньше, но разрешающая способность в 2 раза выше — 0,45.

При настройке осветительной системы нужно помнить, что освещение объекта играет решающую роль, поэтому совершенно необходимо подобрать условия освещения, исходя из правила — чем больше уве-

* Подробная схема устройства микроскопов описана в прилагающихся к ним инструкциях, поэтому здесь мы на этом не останавливаемся.

личение, тем ярче источник света. При работе с конденсорами следует пользоваться плоским зеркалом микроскопа. Освещение устанавливают по методу Келлера: источник света располагают перед микроскопом на расстоянии 30—40 см, фокусируют нить лампы на плоское зеркало, покрытое фильтровальной бумагой, при этом ирис-диафрагма осветителя должна быть полностью открыта. Затем на правую ножку микроскопа кладут небольшое плоское зеркало под углом, позволяющим сверху видеть отражение поверхности ирис-диафрагмы и нижней линзы конденсора. Далее ирис-диафрагму конденсора (апертурную диафрагму) полностью закрывают, убирают плоское зеркало и направляют изображение нити лампы на нижнюю поверхность закрытой апертурной диафрагмы, резко фокусируя изображение нити путем поворота коллектора осветителя при полностью открытой диафрагме. Затем открывают апертурную диафрагму микроскопа, убавляют свет до красно-желтого накала и фокусируют объектив с увеличением 10 на препарат. Зеркалом ловят изображение линзы коллектора и находящейся при ней диафрагмы поля. Закрыв диафрагму поля (при конденсоре), мы увидим в микроскопе резкое изображение ее смыкающихся краев. При окончательной фокусировке это изображение должно быть окружено красной или голубой четкой каймой. Толщина покровных стекол не должна превышать 1,1—1,4 мм. При отсутствии осветителей можно пользоваться и дневным светом, но в этом случае возможны погрешности изображения и, кроме того, не используются все возможности микроскопа.

II.1.2.1. МИКРОСКОПИРОВАНИЕ С СУХИМИ И ИММЕРСИОННЫМИ СИСТЕМАМИ

Под сухими системами понимают объекты (на предметном стекле в воде или другой жидкости с подобным коэффициентом преломления), прикрытые сверху сухим покровным стеклом. В иммерсионных системах объект исследования и объектив микроскопа находятся в одной среде — воде или масле (соответственно различают водную и масляную иммерсию). При изучении объекта в иммерсионной системе масло или воду наносят на стекло, устанавливают тубус на нужную высоту и опускают его до полного погружения фронтальной линзы объектива в масло. При этом используют диафрагму с наибольшим отверстием. Для просмотра большого количества препаратов обычно пользуются водной иммерсией (объектив $\times 40$ с белой полоской), так как это позволяет работать гораздо быстрее (не надо смывать масло), используя временные препараты; упрощает и облегчает исследование подвижного материала (выход аскоспор, зооспор и т. д.). Масляная иммерсия обеспечивает большую яркость и четкость изображения и поэтому применяется шире.

II.1.2.2. МИКРОСКОПИЯ В ТЕМНОМ ПОЛЕ

Применяется при исследовании мелких неокрашенных объектов. Темное поле зрения можно создать в любом микроскопе, заменяя обычный конденсор темнопольным ОИ-13. На чистое, промытое в хромовой смеси предметное стекло наносят каплю стерильной воды, помещают в нее исследуемый объект и осторожно накрывают покровным стеклом (недопустимо образование пузырьков); толщина предметного стекла не должна превышать 1,1, а покровного — 0,17 мм. Далее конденсор немного опускают, наносят на него каплю кедрового масла, после чего опять поднимают до тех пор, пока капля равномерно не

распределится между поверхностями конденсора и предметного стекла. При этом необходимо пользоваться сильным источником света, а лучи его направлять в микроскоп плоским зеркалом. Сначала препарат наблюдают не через окуляр, а сбоку и, меняя положение зеркала, добиваются получения однородного темного поля, на фоне которого выделяются ярко освещенные гифы и споры. Метод получил признание при изучении строения плазмы и ядер клеток, так как дает возможность разделять фазы коллоидных систем.

II.1.2.3. РИСОВАЛЬНЫЙ АППАРАТ

Наиболее удачно приготовленные типичные временные и постоянные препараты можно фотографировать. Микрофотографирование препаратов микологических объектов осуществляется обычным способом [316]. Поскольку при этом не всегда удается получить четкое изображение отдельных структур, исследуемый препарат параллельно зарисовывают с помощью рисовального аппарата. Обычно применяют рисовальный аппарат типа РА-4 [316], позволяющий довольно точно передать на рисунке контуры и соотношения отдельных частей исследуемого объекта. Для уточнения изображения акцентируемые детали и штрихи дорисовывают.

Для выполнения рисунка тубус микроскопа устанавливают на необходимую высоту, заменяют бинокляр монокуляр, надевают на него рисовальный аппарат так, чтобы призма его была расположена горизонтально, а диск со светофильтрами свободно вращался. Столик устанавливают так, чтобы бумага находилась на расстоянии 250 мм, от окуляра, считая этим расстоянием сумму кратчайших расстояний от куба вращения (призмы) до оси вращения зеркальца и от них до бумаги. При выполнении рисунков крупных объектов — срезов плодовых тел сумчатых грибов — пользуются окулярами $\times 1$ или 3 и объективами $\times 7$ или 10, а более мелких — окулярами $\times 10$ или 15 и объективами $\times 20$ или 40. При настройке аппарата добиваются совмещения полей зрения обоих глаз (сначала ориентируются на четкую видимость кончика карандаша на фоне бумаги), а также одинаковой степени освещения бумаги и препарата (с помощью системы дымчатых светофильтров). Если светофильтры не могут уменьшить освещение бумаги, тогда выбирают наименее освещенное место или затевают столик дополнительным экраном. Рисунок выполняют карандашом четкими линиями без наложения теней; внешние линии делают более толстыми, внутренние — более тонкими; затем наносят контуры тушью. Объем и плотность принято передавать точками, располагающимися более или менее густо. Следует указывать увеличение, при котором выполнен рисунок.

II.1.2.4. ИЗМЕРЕНИЕ ОБЪЕКТОВ ПРИ МИКРОСКОПИИ

При измерениях с помощью микроскопа пользуются следующими измерительными приборами: окулярным микрометром (окулярмикрометр), объективным микрометром (объектмикрометр) и счетной камерой. Наиболее часто применяют окулярмикрометр, который и можно считать основным прибором для измерения микрообъектов.

Окулярмикрометр представляет собой стеклянную пластинку, в центре которой нанесены либо 100 делений, составляющих 1 см, либо 50 делений, составляющих 0,5 см. Для измерений пластинку вставляют в окуляр, предварительно отвинтив верхнюю линзу таким обра-

зом, чтобы ее калиброванная поверхность была обращена внутрь окуляра. После этого в окуляр ввинчивают (не до упора) верхнюю линзу. Окуляр вставляют в микроскоп и добиваются предельно четкой видимости. После этого линзу закрепляют.

Перед тем как приступить к измерению при определенном увеличении микроскопа, необходимо установить значение одного деления окулярмикрометра в микронах. Для этого берут объектмикрометр, представляющий собой предметное стекло, в середине которого выгравирована шкала длиной в 1 мм, разделенная на 100 равных частей (цена деления 10 мкм). Потом фокусируют микроскоп и добиваются предельно четкой видимости делений окулярмикрометра и объектмикрометра. Далее при помощи препаратоводителя устанавливают объектмикрометр так, чтобы шкалы микрометров точно совпали. Отсчитывают, скольким делениям окулярмикрометра соответствует определенное число делений объектмикрометра. Эту операцию повторяют несколько раз. Все полученные данные записывают в две колонки. Обычно стараются отметить возможно большее количество совпадения делений и измеряют их 5—10 раз в зависимости от однородности получаемых данных. Потом для каждого измерения производят расчет следующим образом: умножают количество делений объектмикрометра на 10 мкм (поскольку каждое деление объектмикрометра равно 10 мкм) и делят произведение на количество делений окулярмикрометра. Таким образом находят значение одного деления окулярмикрометра. Из каждой пары значений вычисляют среднее. Например, допустим, что при определенном увеличении 50 делений окулярмикрометра совпадают с 20 делениями объектмикрометра. В этом случае вся длина шкалы окулярмикрометра составляет $20 \times 10 = 200$ мкм. Это число делят и находят цену одного деления — 4 мкм.

Размер исследуемого объекта определяют умножением числа делений окулярмикрометра, которым соответствует длина или ширина объекта, на значение одного деления в микронах. Например, длина конидии составляет 5 делений. Умножаем это число на цену одного деления — 4 мкм. В этом случае абсолютная длина конидий равна 20 мкм. Однократное измерение длины (или ширины) не дает представления о действительном размере, поэтому необходимо проводить несколько измерений, а затем вычислять среднее и искать ошибку методом вариационной статистики [233, 386, 431].

Для удобства работы обычно составляют табличку, на которой приведены значения деления окулярмикрометра для всех возможных оптических комбинаций и результаты умножения их величин на ряд последовательных чисел до 20 или более. При работе с рисовальным аппаратом пользуются еще и другой шкалой. Для изготовления ее в микроскоп вместо предметного стекла помещают объектмикрометр и с помощью рисовального аппарата срисовывают его деления или часть их на бумагу, которую помещают точно на расстоянии 250 мм от окуляра. Такой рисунок изготавливают для всех увеличений, например для объектива $\times 10$, $\times 40$ со всеми имеющимися окулярами и т. д. Эти данные наносят на четыре стороны прямоугольной картонной карточки, которая в дальнейшем служит для измерения объектов. Для проведения измерений таким способом объект помещают на столик микроскопа, а карточку со шкалой — на бумагу под рисовальным прибором. Совмещая изображения, определяют размеры объекта. В тех случаях, когда есть рисунок, выполненный с помощью такой же оптической системы (объектива и окуляра), измерение деталей его проводят так: располагают рисунок строго на расстоянии 250 мм от окуляра,

помещают на тубус микроскопа рисовальный аппарат, а на столик микроскопа — объектмикрометр и, добившись требуемой четкости изображения, измеряют объект в единицах объектмикрометра. В этом случае получают абсолютные значения величин без пересчетов.

При измерении объекта окулярмикрометром в объективе Гюйгенса его помещают между обеими линзами на поверхности диафрагмы, ограничивающей место действительного изображения. Поскольку окулярмикрометр рассматривается только одной линзой (находящейся ближе к глазу), точность измерения относительна. Поэтому для получения точных измерений, пользуются окулярами Рамсдена.

II.1.3. ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В СВЕТОВОМ МИКРОСКОПЕ

II.1.3.1. ПОДСЧЕТ КОНИДИЙ

Обработка конидий для подсчета. Для подсчета количества конидий, не смачивающихся водой, рекомендуется подготовить их следующим образом: в пробирку со стерильным смывом конидий добавляют этиловый эфир из расчета 0,03—0,04 мл (3—4 капли при диаметре пипетки 1 мм) на 5 мл жидкости. Полученную смесь тщательно взбалтывают и оставляют на 30—40 мин. Пробирки закрывают не очень плотно, чтобы эфир мог испаряться. За это время жировой слой оболочки конидий, обуславливающий несмачиваемость, растворяется, конидии оседают, но при взбалтывании равномерно распределяются в толще жидкости. Подготовленные таким способом конидии удобно считать в счетной камере, а данные этих подсчетов можно использовать при построении калибровочной кривой для конидий каждого исследуемого вида грибов и определять их количество в 1 мл жидкости с помощью ФЭКа [214, 342].

Счетная камера. Для точного подсчета количества конидий или других элементов, взвешенных в жидкости, применяют счетную камеру. Она представляет собой толстое предметное стекло, на котором вышлифована пластинка, поверхность которой на 0,1 мм ниже поверхности стекла. На пластинке выгравированы взаимноперпендикулярные линии, расстояние между которыми равно 50 мкм, т. е. стороны квадратов, образуемых пересечением этих линий, равны 50 мкм, или $\frac{1}{20}$ мм. Если в камеру помещают жидкость, то каждый квадрат рассматривают как основание прямоугольной призмы со стороной $\frac{1}{20}$ и высотой 0,1 мм. Объем такой «жидкой» призмы равен $\frac{1}{4} 000$ мм. При исследовании взвеси спор подсчитывают количество спор или конидий в единице жидкости, а затем и во всей жидкости, если объем ее известен. Необходимо помнить, что 1 мм³ в 4000, а 1 см³ — в 4 000 000 раз больше объема одной призмы.

В лабораторной практике обычно пользуются камерами Тома, Нейбауера, сеткой Предтеченского и т. д. В камере Тома и сетке Предтеченского очерченная на пластинке площадь равна 1 мм². На каждой камере обозначены числовые характеристики.

Количество конидий или отдельных клеток в 1 мм³ вычисляют по формуле $X = ab \cdot 4000$, где a — количество клеток в определенном объеме камеры; b — число сосчитанных квадратов. При пересчете на 1 см³ произведение ab умножают на 4 000 000. Подсчет проводят в каждом квадрате по диагонали. Для очень разбавленных смесей за единицу поверхности принимают не один квадрат, а всю камеру. Та-

ким образом подсчитывают также крупные конидии, делящиеся гифы и другие объекты, для изучения которых пользуются малым увеличением микроскопа. Для большей точности подсчитывают конидии не в одной, а в нескольких каплях исследуемой взвеси. Полученные данные рекомендуется обработать методом вариационной статистики [386].

II.1.4. ИЗУЧЕНИЕ ОБЪЕКТОВ В ЖИВОМ СОСТОЯНИИ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

II.1.4.1. МЕТОД РАЗДАВЛЕННОЙ КАПЛИ

В живом состоянии обычно изучают объекты, которые надо идентифицировать без дополнительной окраски, требующей фиксации [234, 291].

На хорошо вымытое и высушенное предметное стекло наносят каплю воды и помещают в нее исследуемый материал. Препарат покрывают покровным стеклом и исследуют сначала при малом, а затем при большом увеличении. При изучении гифальных грибов, особенно строения их конидиеносного аппарата, необходима предварительная специальная обработка препаратов [264, 526]. Если исследуют грибы, имеющие легко растворяющиеся структуры, или цепочки спор, препараты готовят на смеси спирта, глицерина и воды (1 : 1 : 1). Для обнаружения проростковых пор, изучения строения оболочки конидий и других элементов конидиеносного аппарата проводят мацерацию объекта [234]. Для выявления стадийности роста, типа прорастания, различных закономерностей физиологии грибы культивируют в камерах Ранвье, кольцах Ван-Тигема и т. д. [316].

Морфологические исследования можно проводить не только в жидкой среде, но также в агаризованной по методу Пидопличко [353]. Предметные стекла промывают несколько раз в хромовой смеси, сушат, складывают в пачки, заворачивают в бумагу и стерилизуют в автоклаве. При посеве извлекают по одному стеклу, дополнительно прокаливают его над пламенем газовой горелки, быстро наносят раскаленной стерильной петлей небольшую каплю расплавленной агаровой среды и дают ей слегка остыть. Тут же у горелки наносят иглой посевной материал, стараясь, чтобы он попал в центр капли. Покровное стекло, подготовленное таким же образом, как и предметное, прокаливают над горелкой, чуть отводят от пламени, чтобы оно слегка остыло, и накладывают на каплю среды с посевным материалом, находящуюся на предметном стекле. Покровное стекло осторожно придавливают до тех пор, пока агаровая среда не распределится равномерно сужающимся тонким слоем, и располагают его под углом 10—15° к предметному стеклу. Покровное стекло с трех сторон, за исключением поднятой, рекомендуется заливать парафином, чтобы избежать загрязнения и высыхания. Предметное стекло с препаратом кладут в чашку Петри так, чтобы та сторона, где предметное и покровное стекла не соприкасаются, была направлена вверх, и помещают в термостат. В зависимости от цели опыта наблюдения за посевным материалом ведут через определенные промежутки времени. Прорастание спор требует особенно тщательных наблюдений и поэтому в зависимости от вида гриба следует начинать наблюдения через несколько часов (2—12) после посева. Препараты вынимают из термостата, микроскопируют и быстро помещают обратно. Для получения типичного спороношения у гифальных грибов

и изучения их развития в онтогенезе применяют метод микрокультуры [59, 94] (см. раздел IV.4.6.)

Нефиксированные препараты, особенно грибы с бесцветными органами спороношения, перед исследованием окрашивают. Витальное окрашивание представляет собой сложную реакцию, с помощью которой можно воспроизвести модель некоторых процессов клеточного обмена, и не вызывает заметных нарушений жизнедеятельности объек-

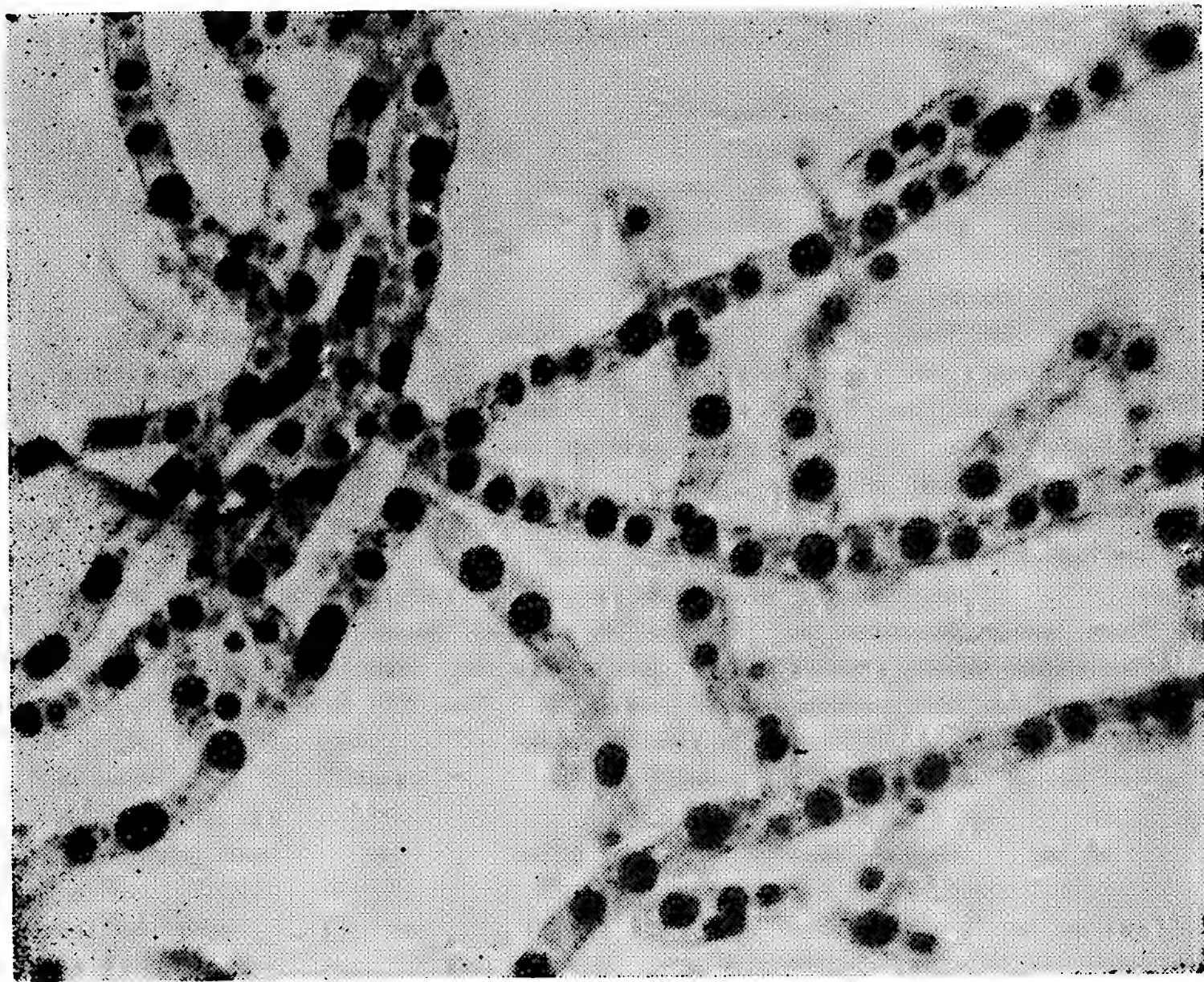


Рис. 46. Метакхроматиновые включения в гифах фузария, окрашенные нейтральной красной.

тов исследования. Основной краской гранулярного типа, применяемой для этих целей, является нейтральная красная [рис. 46]. При подкрашивании клетки 0,02%-ным раствором нейтральной красной вакуоли приобретают розовую окраску, а гранулы метакхроматина — ярко-красную [316, 358].

При исследовании объектов методом «раздавленной капли» можно измерить рН в живом препарате с помощью специальной микрошкалы, устроенной по типу окулярмикрометра. Для получения шкалы используется индикатор метиловый красный. Индикаторный листок окрашивают до желаемой густоты, нагревая его в концентрированном растворе индикатора, разрезают на полоски 1—2 мм в длину и 0,5—0,75 мм в ширину, помещают в буферные растворы с различными значениями рН, подсушивают и по окраске, соответствующей определенным значениям рН, составляют шкалу с ценой деления 0,2 ед. рН. При использовании естественного индикатора — антоциана, получаемого при кипячении лепестков цветов традесканции (*Tradescantia virginica*) в воде,

можно составить шкалу с ценой деления 0,5 ед. рН. Для этого листочки шкалы приклеивают на круглое покровное стекло канадским бальзамом, накрывают вторым покровным стеклом и все это вклеивают в металлическое кольцо (диаметр 19 мм), по краю которого наносят соответствующие значения рН. С помощью этой шкалы можно изучать действие различных кислот и углекислого газа на живую клетку [26].

II.1.5. ИЗУЧЕНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ

II.1.5.1. МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ

Основная цель фиксации — прервать течение жизненных процессов объекта исследования и сохранить неизменной тонкую структуру его клеток.

Кипячение применяют при изучении морфологических особенностей мицелия, выросшего в естественных условиях или в культуре на жидких и агаризованных средах. При этом в пробирку с кипящей водой погружают и тут же извлекают объект исследования.

Высушивание применяют при цитологических исследованиях. На предметное стекло в каплю воды помещают препарат, подсушивают на воздухе в течение 20—30 мин.

Фиксация химическими реактивами. *Этиловый спирт* (96%-ный) хорошо фиксирует мицелий, полученный в культуре. Время фиксации мицелия — до 1 ч, конидий — 30 мин — 1 ч, прорастающих конидий — 2—5 мин. *Спирт с формалином* применяют при исследовании внешних структур, не содержащих клеток. Состав: спирт (70%-ный), формалин (94—98%-ный) (6 : 2). Время фиксации от 1 мин до суток. *Спирт с уксусной кислотой* применяют при изучении ядер. Состав: спирт (96%-ный), уксусная кислота крепкая (2 : 1). Время фиксации 6—24 ч. *Жидкость Карнуа* применяют при цитологических исследованиях. Состав: абсолютный спирт, хлороформ, уксусная кислота ледяная (6 : 3 : 1). Время фиксации — от нескольких минут до нескольких часов. Жидкость Карнуа особенно рекомендуется при последующем окрашивании препаратов фуксином и эритрозином. *Жидкость Флемминга* считается наилучшим фиксатором при цитологических исследованиях. Состав: хромовая кислота 1%-ная (25 мл), уксусная ледяная кислота (10 мл), осмиевая кислота 2%-ная (10 мл). Время фиксации — 1—15 мин. *Фиксатор Шаудина* используют при изучении ядер. Состав: по 2 части насыщенного водного раствора сулемы и абсолютного спирта, 1 часть 2%-ной уксусной кислоты.

После фиксации препарат обязательно промывают дистиллированной водой до полного исчезновения фиксатора.

II.1.5.2. ОСНОВНЫЕ КРАСИТЕЛИ

Наиболее часто применяемые в микологической практике красители для контрастного окрашивания мицелия — метиленовый синий, метиловый фиолетовый, генциановый фиолетовый, раствор Люголя [451].

Метиленовый синий применяют в виде спиртовых, водных, щелочных растворов: 1) спиртовой раствор: к 100 мл 96%-ного спирта добавляют 3 г краски, взбалтывают, оставляют отстояться на несколько суток, фильтруют; перед употреблением разводят в 5—10 раз; раствор прочный; 2) водный раствор: к 100 мл воды добавляют 2 г краски,

отстаивают 2 сут; периодически взбалтывают. На дне сосуда должен остаться избыток нерастворенной краски. Раствор быстро портится; 3) щелочной раствор (синь Леффлера): к 100 мл дистиллированной воды добавляют 30 мл насыщенного спиртового раствора краски и 1 мл 1%-ного раствора едкого кали. Раствор сохраняется долго. Для приготовления полупостоянных препаратов применяется раствор метиленового синего, 96%-ного спирта, глицерина и воды (1 : 1 : 1 : 1).

Метиловый фиолетовый: 1) к 96 мл воды добавляют 4 мл анилина, хорошо взбалтывают и добавляют 10 мл насыщенного раствора краски; 2) к 20 мл дистиллированной воды добавляют 2,5 мл уксусной кислоты, затем 10 мл насыщенного спиртового раствора краски. *Генциановый фиолетовый* применяется обычно в виде 1—0,1%-ного водного раствора. Способ приготовления такой же, как и предыдущего красителя.

Раствор Люголя: растворяют 2 г йодистого калия в 5 мл воды, затем добавляют 1 г металлического йода. Объем доводят до 300 мл дистиллированной водой.

II.1.5.3. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ОКРАШИВАНИЕ СОДЕРЖИМОГО ГИФ ГРИБОВ

Готовят смесь Судана 3, хлопчатобумажного синего и йода в молочной кислоте (1 : 1 : 1). В гифах жир окрашивается в ярко-оранжевый цвет, гликоген — в буро-красный, а протоплазма — в синий.

II.1.5.4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ

Окрашивание амилоидной оболочки. Применяют для большинства базидиальных, сумчатых и несовершенных грибов. Краситель — раствор Люголя. Несколько капель раствора добавляют к готовому препарату на предметное стекло. Время окрашивания от нескольких секунд до 1 ч. Амилоидные оболочки окрашиваются в синий цвет.

Окрашивание клеточной оболочки. 1. *Танин* применяют для окрашивания всех групп грибов. Препарат фиксируют над пламенем горелки и добавляют каплю 20%-ного водного раствора танина. Время окрашивания 20—30 мин.

2. *Метод Гутштейна.* Препарат фиксируют на предметном стекле над пламенем горелки, помещают на 20—30 мин в 5%-ный раствор танина, промывают водой 1—5 мин и окрашивают карболфуксином (фуксин, карболовая кислота, спирт, вода — 1 : 5 : 10 : 100) в течение 1—2 мин; тщательно промывают. Оболочка окрашивается в интенсивно красный цвет.

3. *Метод Кнейси.* Препарат фиксируют на предметном стекле над пламенем горелки и помещают в раствор, состоящий из 70 мл насыщенного водного раствора калийных квасцов и 30 мл 20%-ного водного раствора танина на 2—3 мин. Промывают дистиллированной водой 3—5 мин, добавляют каплю карболфуксина и накрывают покровным стеклом, не удаляя краски. Оболочка окрашивается в синий цвет.

4. *Метод Пешкова.* Применяют для дрожжей и низших грибов. Препарат фиксируют в жидкости Карнуа и опускают на 2—5 мин в 10%-ный водный раствор танина, тщательно промывают и красят фуксином Пфейфера в течение 30—60 с, не промывая микроскопируют. Оболочки окрашиваются в синеватые цвета [352].

5. *Окрашивание генциановым фиолетовым и конго красным.* Применяют для всех грибов. Препарат фиксируют любым способом, помещают в 0,5%-ный водный раствор генцианового фиолетового на 1,5—2 мин, промывают, помещают в 0,5%-ный водный раствор конго красного

на 2—3 мин, промывают, подсушивают. Оболочки окрашиваются в темно-синий или черный цвет.

Окрашивание целлюлозы. 1. *Реактив Швейцера.* Применяют для всех видов грибов. 20 г хлорцинкйода растворяют в воде, добавляют 6,5 г йодистого калия и после его растворения 1,3 г металлического йода. Объем раствора доводят до 10 мл дистиллированной водой. Реактив держат в темной посуде. Целлюлоза окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

2. *Флороглюцин.* Готовят насыщенный раствор флороглюцина в воде, который добавляют по капле под покровное стекло, или же готовят препарат непосредственно на нем. Прибавляют каплю соляной кислоты. Целлюлоза окрашивается в интенсивный фиолетовый цвет или темно-винно-красный.

Окрашивание лигнина. Препарат фиксируют над пламенем горелки на предметном стекле, добавляют туда же несколько капель 1%-ного сернокислого анилина. Лигнин окрашивается в золотисто-желтый цвет.

Окрашивание пектиновых веществ. Препарат фиксируют на предметном стекле над пламенем горелки и добавляют несколько капель 0,5%-ного раствора сафранина в 0,6%-ной уксусной кислоте. Пектиновые вещества окрашиваются в оранжевый цвет.

Окрашивание хитиновых веществ. *Метод Висселинга.* Препарат кипятят в концентрированной щелочи в течение часа, промывают, нейтрализуют серной кислотой до получения нейтральной реакции. Затем добавляют две капли раствора йода в йодистом калии и несколько капель разведенной серной кислоты. Хитин окрашивается в ярко-фиолетовый цвет.

Определение хитина и хитозана в мицелии. Отфильтрованный мицелий помещают в аппарат Сокслета для удаления жира эфиром и, если надо, пигмента. Пигмент удаляют спирто-бензолом (1 : 4), затем отмывают до полного исчезновения спирто-бензола, заливают 4—5%-ным едким натром и кипятят в водяной бане 3—4 ч, после чего проверяют на белок биуретовой реакцией (к 5—6 мл раствора добавляют такое же количество 10%-ного раствора щелочи и хорошо взбалтывают, после чего добавляют 2—3 капли 3%-ного раствора сернокислой меди и слабо нагревают; белок окрашивается в фиолетовый цвет). Если реакция отрицательна, то мицелий отмывают от щелочи до нейтральной реакции и обрабатывают 50%-ным едким натром при 140°C в течение 1—2 ч. Проверяют наличие хитозана качественной реакцией со слабым раствором йода; хитозан окрашивается в фиолетовый цвет. Далее препарат заливают 1—2%-ной уксусной кислотой, в которой хитозан растворяется. После окончательного растворения хитозана, о чем судят по исчезновению фиолетовой окраски, остается хитин, который окрашивается слабым раствором йода в интенсивный коричневый цвет. Для количественного определения полученный материал заливают абсолютным спиртом на 2—3 ч, высушивают в вакууме при 40° С и гидролизуют концентрированной соляной кислотой. Затем определяют количество редуцирующих сахаров (методом Хагедорна — Йенсена).

Окрашивание ядерного аппарата. *Метод Фёльгена* (реакция на ДНК). Препарат фиксируют жидкостью Карнуа в течение 10—30 мин, промывают 80%-ным спиртом и проводят через нисходящие концентрации спиртов. Реакция проявляется только в гидролизованном материале. Последовательность гидролиза: препарат помещают на 2—3 мин в 1 н. раствор соляной кислоты при комнатной температуре, за-

тем на 5—6 мин в 1 н. раствор соляной кислоты, нагретой до 60° С, и снова в первый раствор на 1—2 мин, затем помещают в реактив Шиффа на 2—3 ч. Реактив Шиффа готовят следующим образом: 0,5 г основного фуксина растворяют в 90 мл кипящей дистиллированной воды, охлаждают до 50° С, фильтруют и прибавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты. Отдельно в 10 мл холодной воды растворяют 2 г безводного или 4 г кристаллического сульфата натрия. Полученный раствор сульфата приливают к раствору фуксина, охлажденному до 25° С, или 1 г основного фуксина для фуксинсернистой кислоты растворяют в 200 мл кипящей дистиллированной воды и охлаждают до 50° С, фильтруют и добавляют 20 мл 1 н. соляной кислоты, охлаждают до 25° С и добавляют 1 г метабисульфита натрия или калия. Реактив хранят на холоду в широкой склянке с притертой пробкой. Реактив считается пригодным, пока он сохраняет запах сернистого газа и цвет бледного чая (розовая окраска является признаком непригодности).

Препарат промывают по 15—20 мин в трех порциях сернистых вод и затем в дистиллированной воде. Способ приготовления сернистых вод: 1) к 200 мл дистиллированной воды добавляют 4 мл концентрированной соляной кислоты; отдельно в 25 мл дистиллированной воды растворяют 4 г безводного или 8 г кристаллического сульфата натрия, приливают этот раствор к подкисленной воде, взбалтывают и дают отстояться или 2) 0,5 г метабисульфита натрия или калия, 5 мл 1 н. HCl помещают в колбу и доводят объем раствора до 100 мл дистиллированной водой. Для получения более контрастных препаратов их докрашивают 0,1—0,2%-ным раствором, лучше слабopодкисленным, светлого зеленого или водного голубого (вассерблау). Препарат промывают водой, высушивают, проводят через ряд спиртов восходящей концентрации до абсолютного, ксилол и помещают в бальзам. Ядерные элементы окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, протоплазма при докрашивании приобретает зеленый оттенок. Лучше всего окрашиваются конидии несовершенных грибов.

Трехцветное окрашивание по Флеммингу (модификация для грибов). Препарат фиксируют любым способом, помещают на 5—12 ч в 1%-ный раствор сафранина, который готовят смешиванием 1%-ного раствора водорастворимого сафранина и воды (1 : 1); промывают в воде, затем в спирте, снова трехкратно в воде по 15 мин, затем помещают в 2%-ный водный раствор генцианового фиолетового на 30 мин, промывают водой и помещают в 1%-ный водный раствор оранжа на 1—3 мин, после чего промывают в гвоздичном масле. Протоплазма окрашивается в розовый цвет, ахроматиновые элементы клетчатки — в фиолетовый, хроматиновые структуры — в красный.

Окрашивание гематоксилином Делафильда. Препарат фиксируют 35—50%-ным спиртом и помещают в краситель, для изготовления которого 1 г гематоксилина растворяют в 6 мл абсолютного спирта и этот раствор вливают по каплям в 100 мл насыщенного водного раствора аммонийных квасцов и оставляют стоять в течение недели, затем прибавляют по 25 мл глицерина и метилового спирта и фильтруют через 4 ч. Время окрашивания 3—30 мин. Препарат промывают в нескольких сменах воды 5—30 мин. Для дифференциации структур клетки к воде или спирту добавляют соляную кислоту (1 капля на 100 мл воды); после чего промывают 70%-ным спиртом и водой. Ядра окрашиваются в красный цвет, протоплазма — в фиолетовый.

Окрашивание гематоксилином и эозином (или эритрозинном). Препарат окрашивают гематоксилином Делафильда и дифференцируют подкисленным спиртом. Срезы объекта погружают в 1%-ный спирто-

вой раствор эозина (или эритрозина) на 1—2 мин, проводят через крепкие спирты, промывают как обычно. Ядро и клетчатка окрашиваются в пурпурный цвет, протоплазма — в розовый. Особенно хорошо окрашиваются ржавчинные грибы.

Окрашивание борным кармином. Применяется при изучении ядер, хромосом и т. д. В 100 мл воды, нагретой до 50° С, растворяют 4 г буры, добавляют 3 г кармина, а потом доливают 100 мл 70%-ного спирта и фильтруют. Препарат фиксируют любым способом, промывают, обезвоживают до 50% проводкой через спирты, погружают в краситель

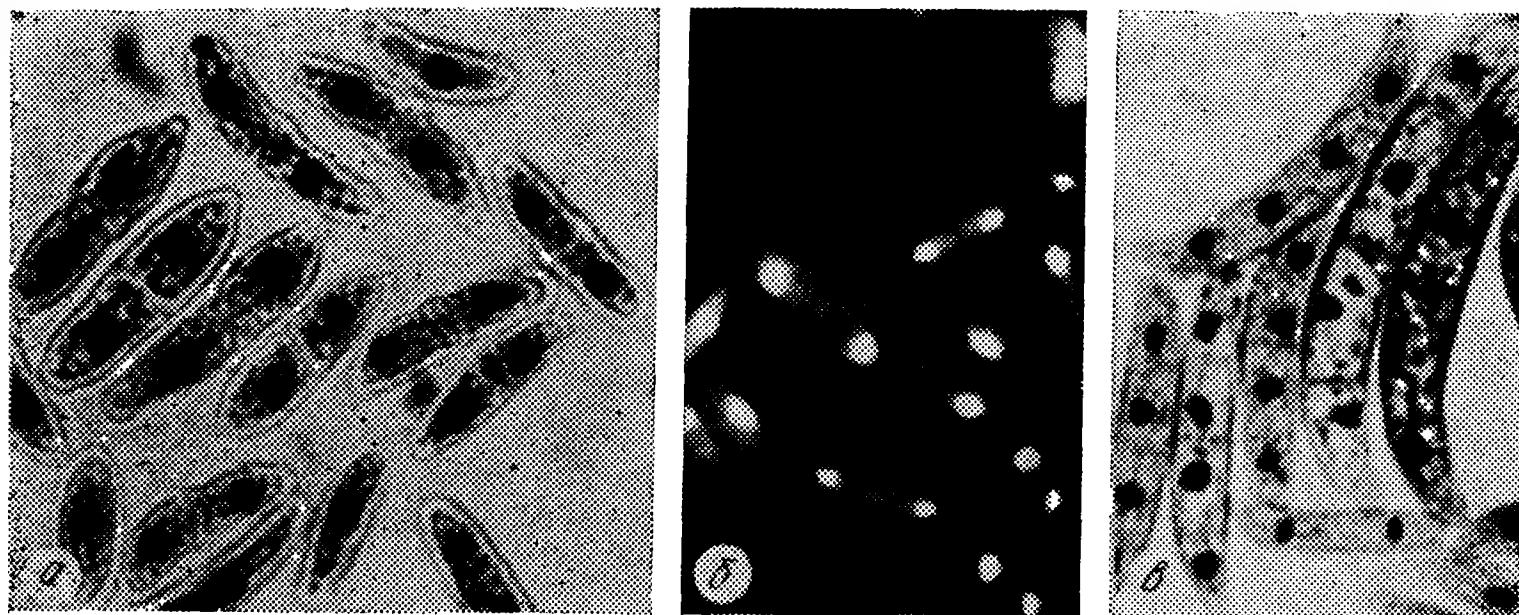


Рис. 47. Ядра в конидиях *Fusarium sambucinum* var. *trichothecioides*, окрашенные методом HCl-Гимза (а); люминесцентный вариант окраски по Фёльгену с аурамином 00 (б); ядра в макроконидиях *Fusarium solani*, окрашенные методом HCl-Гимза (в).

на 1—3 дня, промывают 70%-ным спиртом, подкисленным 1—2 каплями соляной кислоты, 2—3 дня.

Окрашивание ацетокармином. Нефиксированный препарат помещают в краситель, приготовленный следующим образом: насыщают кармином 45%-ный (по объему) водный раствор уксусной кислоты при температуре кипения; после остывания, отстаивания и фильтрации на каждые 100 мл раствора прибавляют 1—2 капли 1—5%-ного раствора уксуснокислого железа. Время окрашивания — 1—24 ч.

Окрашивание пикрокармином. Препарат фиксируют спиртом, промывают водой и помещают в краситель, приготовленный следующим образом: 1 г кармина растворяют в 50 мл воды с 50 мл крепкого аммиака, добавляют 50 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и оставляют в растворе красителя на 2—3 дня, затем фильтруют. Кармины окрашивают ядра в яркий розовый цвет.

Окрашивание методом HCl-Гимза. Особенно хорошо окрашиваются ядра в гифах несовершенных грибов (рис. 47, а, в). Препарат фиксируют метиловым спиртом, смесью спирта с формалином или жидкостью Карнуа по следующей схеме: фиксация жидкости Карнуа 10 мин; промывка в 96%-ном спирте; выдерживание в 70%-ном спирте 30 мин; промывка в дистиллированной воде; выдерживание в холодной соляной кислоте 6 мин; гидролиз 4—6 мин при 60° С; промывка в холодной 1 н. соляной кислоте и дистиллированной воде; выдерживание 15 мин в буферном растворе (фосфатный буфер, рН 6,9), затем 30—40 мин в растворе Гимза (исходный раствор и буфер (1 : 1) готовят непосредственно перед употреблением).

Приготовление раствора Гимза: 3,8 г азурэозина растворяют в 125 мл глицерина при 60° С, добавляют 395 мл метилового спирта и фильтруют. Ядра окрашиваются в синий цвет. При микроскопировании препарат помещают в глицерин.

Окрашивание митохондрий. Живые препараты помещают в 0,01%-ный водный раствор януса зеленого (рН 5,6) на 30 мин. Митохондрии окрашиваются в голубой цвет. Высушенные препараты выдержи-



Рис. 48. Метахроматиновые включения *Fusarium moniliforme*, окрашенные методом Мейера.

ют в 10%-ном растворе формалина 1 ч, тщательно промывают водой и окрашивают 0,1%-ным раствором амидо черного 10 В в цитратном буфере (рН 3) в течение 10 мин. Митохондрии имеют вид сферических и нитчатых темных структур на фоне бледно-голубой цитоплазмы. Приготовление раствора красителя: к 5,252 г лимонной кислоты прибавляют 50 мл 1 н. раствора едкого натра и доводят объем раствора до 250 мл дистиллированной водой. В 50 мл приготовленного раствора растворяют 50 мг краски [752].

Окрашивание метахроматина (волютина). Метод Нейссера. Препарат фиксируют формалином, промывают, наносят синь Нейссера на 1—2 мин. Затем препарат промывают и красят 1—3 мин везувином (1 г красителя на 300 мл дистиллированной воды). Метахроматиновые зерна окрашиваются в ярко-синий цвет, содержимое клеток — в светло-коричневый.

Приготовление сини Нейссера: 0,1 г метиленового синего, 2 мл этилового спирта, 5 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в 100 мл

воды и непосредственно перед употреблением смешивают в соотношении 2 : 1 с раствором генцианового фиолетового (1 г генцианового фиолетового, 10 мл абсолютного спирта в 300 мл дистиллированной воды).

Метод Мейера. Препарат фиксируют спиртом, окрашивают 1%-ным водным раствором метиленового синего, затем обрабатывают раствором Люголя 1—2 мин и погружают на 2—3 мин в 1%-ный водный раствор серной кислоты. Молодые клетки в серной кислоте совершенно обесцвечиваются, а в старых клетках появляются круглые капли черного цвета. При обработке 5%-ным раствором соды базофильные сегменты не обесцвечиваются, а капли гликогена обесцвечиваются. Волютин, накопившийся в клетках, хорошо растворяется в воде, сохраняет окраску в 1%-ной серной кислоте и обесцвечивается 5%-ным раствором соды. Хроматин хорошо фиксируется кипяченой водой, обесцвечивается 1%-ным раствором серной кислоты, не обесцвечивается 5%-ным раствором соды.

Модификация метода Мейера. Препараты фиксируют по Карнуа в течение 5—15 мин, затем окрашивают в сини Леффлера 10 мин. Для дифференциации волютина препарат помещают в 1%-ный раствор серной кислоты, а хроматина — в 4%-ный раствор соды. Дальнейший ход окрашивания такой же, как в методе Мейера. Возможна дополнительная окраска 1%-ным хризоидином или везувином (рис. 48).

Метод Раскиной [352]. Препарат фиксируют на предметном стекле над пламенем горелки. К 4 мл карболового фуксина по Цилю (1 г фуксина, 5 г карболовой кислоты, 10 мл спирта, 100 мл дистиллированной воды) добавляют 4 мл 7%-ного раствора метиленового синего, 5 мл ледяной уксусной кислоты, 95 мл 95%-ного спирта и 200 мл дистиллированной воды. Раствор взбалтывают и погружают в него препарат на 15—20 мин. Затем препарат подогревают на пламени горелки до испарения спирта, промывают дистиллированной водой и сушат на воздухе. Волютин окрашивается в темно-синий цвет.

Окрашивание жировых включений. Жировые включения, выявляемые цитологическими методами, являются резервными липидами. При окрашивании клеток четырехокисью осмия они приобретают черный цвет. Реакция обусловлена связыванием красителя с ненасыщенными жирными кислотами. Красители судан 3, 4 и судан черный растворяются в капельках жира, причем судан черный — в фосфолипидах. Обычно применяют насыщенные растворы этих красителей в 70%-ном спирте.

Окрашивание нейтральных жиров. Препарат фиксируют 1%-ным формалином, промывают 70%-ным спиртом, погружают в краситель на 1 мин, промывают 50%-ным спиртом и окончательно дистиллированной водой. Красители — смесь судана 3 и 4 (1 : 1) готовят в темной посуде. Отдельно готовят смесь ацетон — этиловый спирт (70%-ный) (1 : 1), встряхивают. Сливают полученный раствор в склянку с суданом (1 : 1), хорошо перемешивают и выдерживают в темноте несколько дней. Для работы отбирают надосадочную жидкость пипеткой. Для получения контрастных препаратов содержимого клетки их докрашивают гематоксилином Эрлиха в течение 1—3 мин и промывают дистиллированной водой с несколькими каплями аммиака (рис. 49). Липиды окрашиваются в оранжево-красный или фиолетовый цвет, ядра — в ярко-синий.

Окрашивание нейтральных и кислых липидов нильским голубым. Препарат, фиксированный любым фиксатором, помещают в 1%-ный водный раствор нильского голубого на 5 мин при 60° С. Нейтральные

липиды окрашиваются в красный или розовый цвет. Для выявления кислых жиров препарат докрашивают 0,02%-ным раствором (5 мл 1%-ной краски и 245 мл дистиллированной воды) нильского голубого при 60° С с промывкой и дифференциацией, как и в предыдущем методе. Кислые жиры окрашиваются в синий цвет.

Окрашивание фосфолипидов. Препарат помещают на 1—1,5 ч при 60° С в краситель, который готовят из смеси 500 мл насыщенного водного раствора нильского голубого и 50 мл 0,5%-ной серной кислоты, кото-

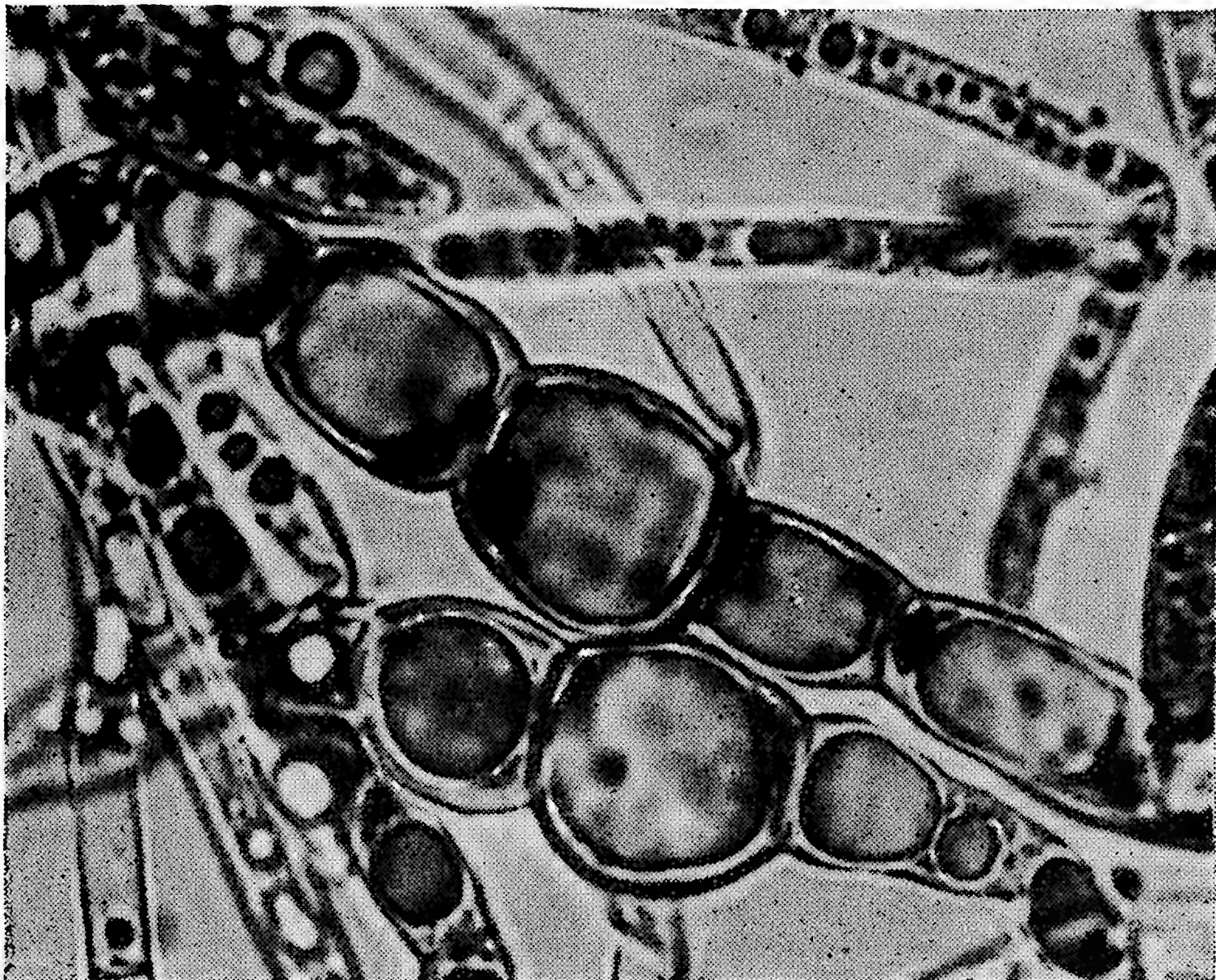


Рис. 49. Жировые включения *Fusarium culmorum*, окрашенные суданом 3.

рую перед употреблением кипятят 2 ч на водяной бане. Затем препарат промывают в дистиллированной воде и помещают в подогретый до 50° С ацетон на 20—30 мин, переносят в 5%-ную уксусную кислоту на 20—30 мин, промывают и дифференцируют в 0,5%-ном растворе соляной кислоты в течение 3 мин. Хорошо промывают в дистиллированной воде. Фосфолипиды окрашиваются в голубой цвет.

Окрашивание липопротеиновых телец по Имшенецкому. Препарат фиксируют на предметном стекле над пламенем, обрабатывают насыщенным раствором пикриновой кислоты в течение 5 мин, промывают дистиллированной водой 5—6 раз, окрашивают карболфуксином (1 : 1000) в течение 1—2 мин и докрашивают 0,2—0,5%-ным спиртовым раствором светлого зеленого (лихтгрюн) в течение 20—30 с (иногда дольше). Липопротеиновые тельца окрашиваются в красный цвет.

Окрашивание гликогена. Универсальный метод — окрашивание раствором Люголя. Препарат фиксируют на предметном стекле над пла-

менем горелки, затем окрашивают раствором Люголя в течение 2—3 мин. Гликоген дифференцируется в виде зернышек коричневого цвета.

Метод Шабдаша. Препарат фиксируют над пламенем или спиртом с последующим промыванием водой и обрабатывают 0,01 М раствором периодата калия или натрия (10 мг растворяют в 5 мл бидистиллированной воды в темной склянке), избегая яркого освещения. Затем препарат промывают в трех сменах дистиллированной воды по 3—5 мин в каждой и, слегка подсушив на воздухе, помещают в реактив Шиффа, закрывают пробкой, ставят на лед на 20—25 мин (до обесцвечивания), после чего трижды промывают в сернистой воде. Гликоген окрашивается в ярко-малиновый или винно-красный цвет [471].

Окрашивание меланина. Препарат погружают на 1 ч в 2,5%-ный раствор сульфата железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), промывают в четырех порциях дистиллированной воды по 20 мин в каждой. Затем погружают в 1%-ный раствор феррицианида калия, приготовленного на 1%-ном растворе уксусной кислоты, на 30—40 мин, промывают 1%-ным раствором уксусной кислоты 20—30 мин и дистиллированной водой. Меланин окрашивается в темно-зеленый цвет, протоплазма — бесцветна. Для получения точных анализов применяют дополнительное окрашивание пикрофуксином.

Окрашивание прорастающих конидий. Метод Дэвиса. Пригоден для всех грибов, кроме головневых. Конидии высевают в каплю воды на предметном стекле, которое помещают во влажную камеру и ставят в термостат. Следят за началом прорастания, микроскопируя препарат через соответствующие для данного вида промежутки времени. После прорастания конидий к капле воды добавляют пипеткой пять капель слабого фиксирующего раствора Флемминга и оставляют на 15—20 мин. Фиксатор отсасывают фильтровальной бумагой и промывают препарат в воде 3—4 раза по 3—5 мин, а в последней промывной воде до 1 ч. Отсасывают воду фильтровальной бумагой и подсушивают на воздухе. Погружают препарат на несколько минут в обезвоженный этиловый эфир, слегка подсушивают и, держа стекло наклонно, обливают из пипетки сначала 2%-ным раствором коллодиума, а затем спиртовыми растворами нисходящей концентрации (90, 85, 70, 50, 35%), после чего окрашивают гематоксилином, споласкивают водой и проводят по восходящей серии спиртов. При необходимости готовят постоянный препарат.

Метод Наумова. Применяется для конидий, прорастающих на листе. Исследуемую часть листа помещают без предварительной обработки в 1%-ный водный или молочнокислый раствор хлопчатобумажного, анилинового синего или генцианового фиолетового. Продолжительность окрашивания от нескольких секунд до 1—3 мин. Мицелий, конидии и конидиеносцы, а также участки пораженной ткани окрашиваются в ярко-синий цвет, тогда как непораженная ткань остается неокрашенной.

Дифференциальное окрашивание мицелия грибов в тканях растений. Метод Стоутона. Пригоден для всех грибов. Срезы проводят по нисходящей серии спиртов до воды, помещают на 1 ч в краситель (0,1 г тионина, 100 мл 5%-ного раствора фенола в дистиллированной воде). Проводят препарат через восходящую серию спиртов до абсолютного, окрашивают насыщенным спиртовым раствором оранж С, промывают в спирте, обесцвечивают в ксилоле и готовят постоянный препарат. Гифы грибов окрашиваются в фиолетово-пурпурный цвет, клетчатка — в желтый или зеленый, ядра — в пурпурный.

Метод Кобеля. Применяют для окраски гаусторий ржавчинных, пероноспоровых и других грибов. Живой или гербарный материал окрашивают в молочнокислом растворе анилинового синего (0,1 г анилинового синего, 50 мл молочной кислоты, 100 мл воды) с нагреванием или без него в течение 5 мин, промывают в воде и нагревают в капле молочной кислоты для дифференциации. Гифы и гаустории окрашиваются в синий цвет. Для окраски гиф мучнистой росы используют 0,5%-ный раствор анилинового синего в 1%-ном водном растворе хлористого натрия [191].

II.2. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

II.2.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Метод люминесцентной микроскопии основан на том, что некоторые структуры клетки, облученные световыми лучами сине-фиолетового участка спектра, а также ультрафиолетовыми лучами: определенной длины волны (до 360—365 нм), начинают светиться. Это явление называют фотолюминесценцией или собственно люминесценцией. Структуры большинства видов грибов не обладают таким свойством, но приобретают его при окраске специальными веществами флюорохромами (так называемая вторичная люминесценция). Основные достоинства люминесцентной микроскопии заключаются в высокой чувствительности, специфичности, четкости изображения, возможности применения метода для живых и фиксированных клеток, в удобстве проведения количественных исследований.

II.2.2. ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТОВ

II.2.2.1. ФЛЮОРОХРОМИРОВАНИЕ ЖИВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для прижизненного окрашивания культуру гриба выращивают на стекле в тонком слое агаризованной или в капле жидкой питательной среды. Препарат окрашивают слабым раствором флюорохрома (1: 100 000) и наблюдают в микроскопе. Можно приготовить суспензию клеток гриба в пробирке с красящим раствором и оттуда брать материал для исследования.

II.2.2.2. ФЛЮОРОХРОМИРОВАНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для приготовления фиксированного препарата на стекло наносят каплю воды, в которую помещают исследуемый материал (срезы или части гиф, плодовых тел, конидий), и подсушивают ее на воздухе. Далее следует специальная фиксация, обеспечивающая сродство к тому или иному красителю [9]. Обычно применяют абсолютный спирт, 70%-ный этиловый или метиловый спирт, жидкости Карнуа, Флемминга и др. Срок фиксации — от нескольких минут до 1 ч: для мицелия 30 мин — 1 ч, для конидий 10—30 мин, для прорастающих конидий 5—20 мин. При употреблении формалина продолжительность фиксации составляет 3—5 мин. После этого фиксатор высасывают пипеткой или фильтровальной бумагой, а препарат промывают дистиллированной водой 5—6 раз, подсушивают на воздухе и вносят каплями рабочий раствор флюорохрома. Время окраски зависит от объекта,

Т а б л и ц а 1. Флюорохромы для общего окрашивания клетки

Флюорохром	Концентрация	Цвет люминесценции
Акридиновый оранжевый	1 : 100 000	От зеленого до оранжевого
Акридиновый желтый	1 : 100 000	Желтый
Аурамин О	1 : 100 000	»
Аурофосфин	1 : 500 000	Светло-зеленый
Берберин-сульфат	1 : 100 000	Светло-желтый
Корифосфин О	1 : 100 000	Светло-зеленый
Нейтральный красный	1 : 200 000	От светло-розового до зеленоватого
Примулин О	1 : 100 000	Желтый
Родамин В	1 : 100 000	Светло-желтый
Тиофлавин	1 : 100 000	Светло-зеленый
Трипофлавин	1 : 500 000	»
Флюоресцеин	1 : 100 000	»

Т а б л и ц а 2. Флюорохромы для дифференциальной окраски структур клетки

Флюорохромы	Концентрация	Время обработки, мин	Цвет люминесценции
-------------	--------------	----------------------	--------------------

Д и ф ф е р е н ц и а ц и я я д р а и п р о т о п л а з м ы

<i>Основные</i>			
Корифосфин О	1 : 1000	0,5—1	Желтый
Аурофосфин	1 : 1000	0,5—1	»
Фосфин ЗР	1 : 1000	0,5—1	»
Трипофлавин	1 : 1000	1	Желто-зеленый
Эухризин 2gNX и ЗР	1 : 1000	1—2	Золотисто-желтый
Рэонин А	1 : 1000	1	Зеленый
Морин (спиртовой раствор)	1 : 1000	2	Темно-красный
Нейтральный красный	1 : 1000	5	От светло-розового до зеленовато-желтого
Берберин-сульфат	1 : 1000	0,5—0,1	Светло-желтый
<i>Кислые</i>			
Водный экстракт чистотела	—	1—2	Золотисто-желтый
Водный экстракт кровохлебки	—	1	Желтый
Аминотерефталевая кислота (спиртовой раствор)	—	2—3	Синий

Д и ф ф е р е н ц и а ц и я к л е т о ч н ы х о б о л о ч е к

Розовый красный	1 : 1000	2—5	Оранжево-желтый
Тиазоловый желтый	1 : 1000	1	Синеватый

Флюорохромы	Концен- трация	Время об- работки, мин	Цвет люминесценции
Д и ф ф е р е н ц и а ц и я ж и р о в			
<i>Основные</i>			
Нейтральный красный	1 : 1000	1	Золотисто-желтый
Хлорофилл (спиртовой раствор)	1 : 1000	2—4	Огненно-красный
Магдала красный	1 : 1000	1	Желтый
Фосфин 3	1 : 1000	2	Желто-зеленый
Корифосфин О	1 : 1000	1	»
Примулиновый желтый	1 : 1000	2	Синий
Трипофлавин	1 : 10000	10	Темно-красный
<i>Кислые</i>			
Экстракт чистотела	—	2—4	Бирюзово-голубой
Экстракт кровохлебки	—	2	Желтый
Экстракт ревеня	—	2	Золотисто-желтый

устанавливается экспериментально в каждом случае и обычно длится от нескольких секунд до нескольких минут.

Флюорохромирование следует проводить при строго определенных значениях pH, в зависимости от выбранного красителя [174]. Например, при употреблении раствора акридинового оранжевого с pH 2,5 клетки диффузно светятся зеленым; ядро при этом ярче цитоплазмы. При увеличении pH от 3 до 5 цвет люминесценции цитоплазмы клеток изменяется от зеленого через розовый к красному и кирпично-красному, при pH 5 ядро становится желто-оранжевым, при pH выше 6 все клетки кирпично-красные. Для изучения НК лучше использовать рабочие растворы этого красителя с pH 4—5. Обычно пользуются цитратным или цитратно-фосфатным буфером с pH 4,2—4,4; время обработки — 10 мин; время промывки — 10—12 мин. После промывки препарат подсушивают и помещают в специально приготовленную дисперсную среду, которая не флюоресцирует. Ее готовят из 10 г гуммиарабика, 10 мл воды, 5 мл глицерина и 1 г хлоралгидрата. Препарат накрывают покровным стеклом, предварительно вымытым в хромовой смеси и идеально протертым, и исследуют. Для временных препаратов можно использовать и воду, но все же лучше готовить препараты в дисперсной среде [192]. Для постоянных препаратов готовят среду следующего состава: равные количества глицерина и лимонной кислоты нагревают до полного растворения кристаллов и заливают объект на предметном стекле, сразу накрывая его покровным стеклом.

Для окраски микологических объектов в качестве флюорохромов используют различные красители и пигменты, как правило, в очень низких разведениях (1 : 20 000—1 : 100 000). Подбирая различные флюорохромы для общей окраски клетки или дифференциации ее структур, устанавливают, какое свечение характерно для исследуемого организма в разных условиях.

Иногда применяют несколько флюорохромов. Так, смесь (1 : 1) раствора фуксина (1 : 1000) и корифосфина (1 : 1000) окрашивает ядра в желтый цвет, протоплазму — в красный, ядрышки — в темно-оранжевый, хроматиновые элементы — в зеленый, а кариоплазма остается неокрашенной. Наиболее применяемые флюорохромы приведены в табл. 1, 2.

11.2.2.3. ПРЯМОЕ ФЛЮОРОХРОМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

Флюорохромирование клеточных оболочек и перегородок. Живые и фиксированные препараты обрабатывают водным раствором примулина О (1 : 10 000). Перегородки светятся зеленым цветом (рис. 50). Примулин относится к кислым флюорохромам, светящимся компонентом которых является отрицательно заряженный ион [54].

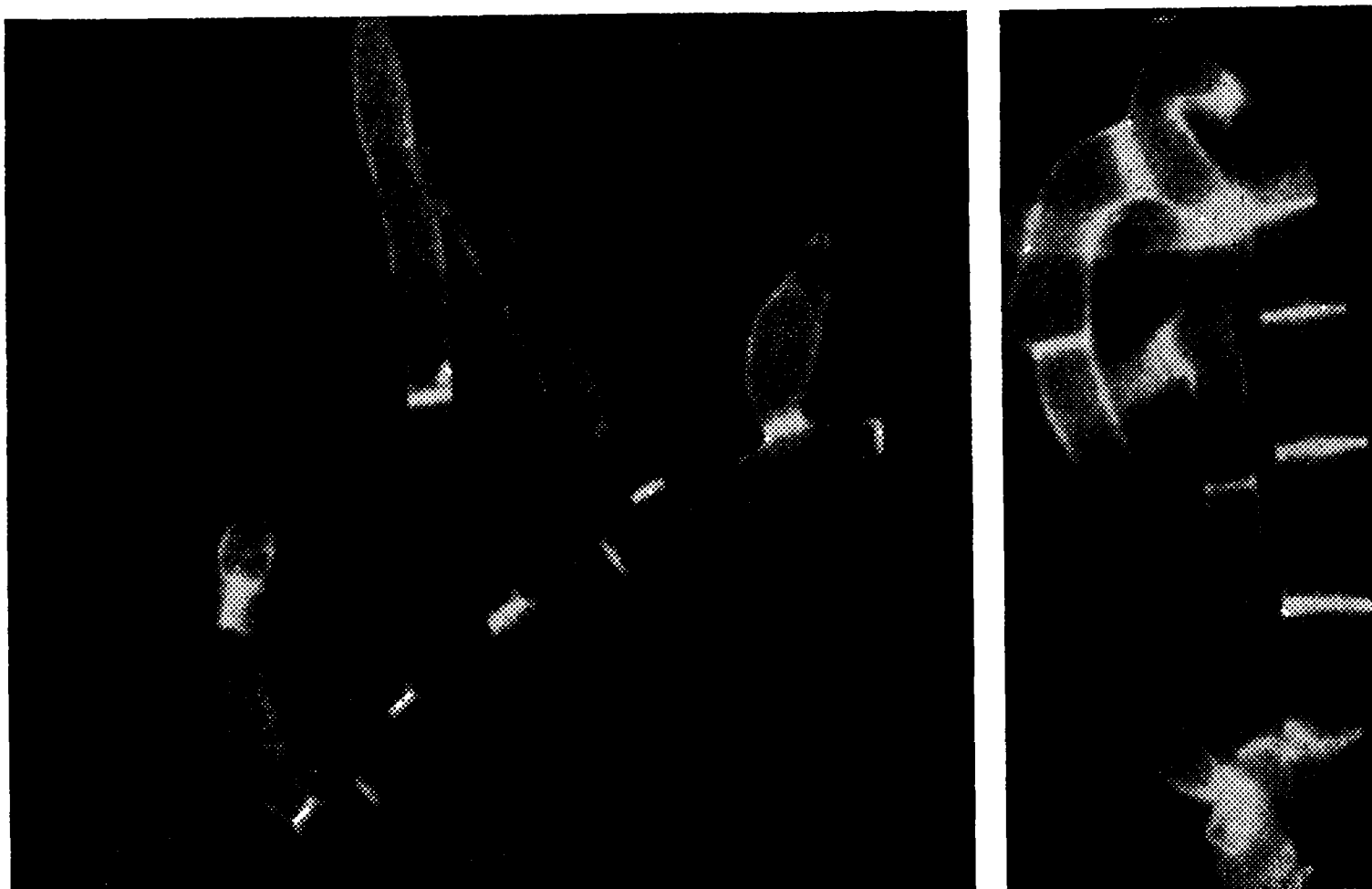


Рис. 50. Свечение перегородок макроконидий, конидиеносцев, гиф *Fusarium javanicum* при флюорохромировании препарата примулином.

Флюорохромирование ядер. Для витального флюорохромирования применяют акридиновый оранжевый в разведении 1 : 100 000. ДНК при этом люминесцирует зеленым светом, РНК красным, протоплазма имеет слабое темно-зеленое свечение, ядро — ярко-зеленое, ядрышки — светло-зеленое, метакроматин — огненно-красное [264, 288]. Флюорохромирование ядер в клетках живых и фиксированных препаратов акридин-ипритом проводят по следующей схеме: фиксация в смеси равных объемов метилового спирта и ацетона — 10 мин при комнатной температуре; проводка через ряд спиртов (96-, 60-, 30%-ный); гидролиз в 2 н. растворе NaOH — 30 мин; окрашивание акридин-ипритом в фосфатно-цитратном буфере (pH 4,5) — 30 мин при температуре 4° С. Концентрация флюорохрома 0,005 мкг/мл. Окрашенные препараты помещают в смесь глицерина и того же буфера (1:1) и сохраняют несколько месяцев в холодильнике [469].

Определение количественного содержания ДНК по люминесцентному варианту метода Фельгена с аурамин-00 проводят по схеме: фиксация в жидкости Карнуа — 5 мин; проводка через нисходящую серию спиртов до воды; промывание в 1 н. соляной кислоте; гидролиз в 6 н. соляной кислоте — 8 мин; промывание в 1 н. соляной кислоте; окрашивание в растворе аурамина — 60 мин; промывка в трех порциях сернистых вод по 3 мин в каждой; промывка в проточной воде — до 20 мин; обезвоживание проводкой через восходящую серию спиртов до абсолютного; помещение препарата в нелюминесцирующее масло. Ядра люминесцируют зеленым цветом. Количественное определение ДНК проводят на микроцитofлюориметре (см. рис. 47, б).

Флюорохромирование митохондрий. Препарат обрабатывают берберин-сульфатом (желтое свечение), ауорофосфином, корифосфином, тиюфлавином (желто-оранжевое свечение) в разведении 1 : 100 000 [289, 290].

Флюорохромирование волютина (метахроматина). Препарат фиксируют метиловым спиртом 8 с; промывают водой и высушивают; окрашивают рабочим раствором корифосфина (2 мл основного раствора корифосфина в разведении 1 : 1000 и 5 мл уксусной кислоты доводят до объема 50 мл дистиллированной водой); промывают водой и высушивают на воздухе. Гранулы волютина имеют огненно-красное свечение.

Флюорохромирование жировых включений. Препарат обрабатывают фосфином 3R (ярко-зеленое свечение), нейтральным красным (желто-зеленое свечение), нильским голубым (оранжевое свечение) в разведении 1 : 100 000 [2].

Люминесцентный спектральный анализ клетки. Методы спектрального анализа позволяют изучать физико-химические процессы, протекающие в живой клетке и ее органоидах, определять соотношения ДНК, РНК, белков и липидов благодаря тому, что многие молекулы, входящие в состав клетки, обладают характерными спектрами поглощения, а зачастую и люминесценции. Спектральные характеристики отражают те изменения структуры данной молекулы, которые определяют их биологические функции. Основными приборами, применяемыми для люминесцентного спектрального анализа, являются микро-спектрофлюориметры и микрофлюориметры [196].

II.2.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МЕРТВЫХ КЛЕТОК

Для определения количества мертвых клеток 1 г сырого мицелия суспендируют в 100 мл водопроводной воды и вносят по 15 мл суспензии в две пробирки. Одну из них помещают на 10 мин или более в кипящую водяную баню до полной гибели клеток. Объем жидкости в пробирке доводят водой до исходного. Затем в обе пробирки вносят по 3 мл раствора примулина в концентрации 1 мг/мл из расчета 1 мл красителя на 5 мл суспензии мицелия и окрашивают в течение 5 мин. Для удаления свободного красителя суспензии центрифугируют при $n = 6000$ об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают, а осадок клеток мицелия, как убитых нагреванием, так и не подвергавшихся кипячению, разводят 15 мл воды и флюориметрируют на флюориметре ФВ-1. В качестве источника возбуждения используют лампу СВД-120А с фильтром УФС-6 ($\lambda = 365$ нм) и скрещенным фильтром ЗС-1.

На флюориметре определяют интенсивность свечения исследуемой взвеси с неизвестным содержанием мертвых клеток (M') и интенсивность свечения взвеси со 100%-ным содержанием мертвых клеток в

1 мл, которое принимают равным 1. Далее вычисляют количество мертвых клеток (М) в исследуемой взвеси как отношение интенсивностей свечения: $\frac{1}{1M'} \cdot 100\%$. Время измерения одной пробы составляет 1—3 мин [67].

Экспресс-метод определения жизнеспособности конидий. Каплю суспензии конидий наносят на чистые предметные стекла или стекла с глицерин-желатиновым покрытием и окрашивают 0,005%-ным водным раствором акридинового оранжевого в течение 3 мин. Живые конидии светятся ярким зеленоватым цветом, мертвые — красным или оранжевым [192].

Метод люминесцентной микроскопии для выявления грибной инфекции в растительных тканях подробно изложен в работах [253, 291].

II.3. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

II.3.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Электронная микроскопия основана на использовании потока электронов, который под действием электромагнитного поля концентрируется или рассеивается так же, как световые лучи при прохождении через систему линз. Электроны, попадая на пластинку, покрытую веществом определенного состава, вызывают ее свечение. Длина волны потока электронов в сотни раз короче световых волн, что значительно увеличивает разрешающую способность электронных микроскопов (25—60 Å). Это позволяет увеличивать объект в 100 000 — 500 000 раз и исследовать его на субклеточном и молекулярном уровнях.

Техника электронной микроскопии и интерпретация данных требуют определенных навыков и тщательного предварительного изучения объекта в световом микроскопе.

II.3.2. ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТОВ

Техника приготовления препаратов для электронного микроскопирования отличается от таковой для световой микроскопии [321, 352, 373, 428, 555, 823]. Для изучения строения поверхности клеток, их формы, структуры, придатков обычно исследуют целые клетки; для исследования тонкого внутреннего строения пользуются ультратонкими срезами, получаемыми на ультрамикротоме.

Препараты готовят не на предметных стеклах, а на специальных пленках (пленках-подложках) из коллодия, формвара (поливинилформальдегида), угля или кварца, толщина которых не должна превышать 200 Å. Чаще всего используют раствор коллодия в амилацетате. Для этого аптечный эфирный раствор коллодия выливают тонким слоем в чашку Петри и высушивают в вытяжном шкафу до образования застывшей прозрачной пленки. После этого чашку с пленкой помещают на 1—2 сут в вакуум (10^{-4} — 10^{-5} мм рт. ст.) и затем растворяют в амилацетате (18—24 ч). При исследовании грибов обычно пользуются 0,5—2%-ными растворами коллодия, учитывая, что концентрация раствора должна соответствовать величине объекта. Раствор готовят в небольших количествах, так как он быстро портится. Для изготовления самой пленки-подложки в чашку Петри наливают дистил-

лированную воду, затем пастеровской пипеткой наносят на ее поверхность каплю раствора коллодия. Амилацетат испаряется, капля растекается по поверхности и быстро застывает в виде тонкой пленки. Первая капля непригодна для работы, так как загрязнена пылью, плавающей на поверхности воды. Поэтому используют пленку от второй, третьей и т. д. капель. Пленку осторожно вынимают из воды пинцетом с тонкими отшлифованными концами.

Для получения очень тонких прозрачных равномерной толщины пленок каплю раствора амилацетата с коллодием наносят на поверхность выпуклого мениска воды, налитой до краев в чашку Петри диаметром 20 см, или же пользуются водой, насыщенной парами амилацетата. В воду, находящуюся в колбе, доливают амилацетат, смесь энергично встряхивают и отстаивают в течение суток. Потом наносят на поверхность такой воды каплю растворенного коллодия.

Для удаления грязи с поверхности воды используют бумажную ленту, длина которой должна быть чуть короче диаметра чашки, а ширина не более 3 см. Оба конца ленты берут пинцетом и погружают в воду вдоль стенок чашки на глубину до 2 см. Концы ленты постепенно сводят в кольцо, потом всю ленту складывают и вынимают из воды. Воду для изготовления пленки используют несколько раз, так как она постепенно насыщается парами амилацетата; хранят в темном месте в сосуде, закрытом притертой пробкой.

Процесс получения более прочных пленок из формвара намного сложнее. Для этого используют поверхность хорошо отшлифованного стекла, которое предварительно промывают и просушивают под струей воздуха. Если стекло было в работе, его необходимо промыть дихлорэтаном, хлороформом или ацетоном и снова дистиллированной водой. После этого на край стекла наносят каплю профильтрованного через беззольный бумажный фильтр 0,15%-ного раствора формвара в дихлорэтано. Стекло быстро встряхивают так, чтобы капля равномерно распределилась по поверхности стекла, а через несколько минут ставят стекло вертикально так, чтобы остатки формвара стекли к нижнему краю. Необходимо следить, чтобы капля при распределении по стеклу не проходила по одному и тому же участку несколько раз. После испарения дихлорэтана на стекле образуется тонкая пленка, которую подсушивают несколько минут при комнатной температуре, иглой или бритвой подрезают ее у края стекла, поддерживают свободный край пинцетом и погружают его в воду под углом 45° . Пленка легко отделяется от стекла и всплывает.

Применяют и другой способ изготовления формварных пленок. Раствор формвара в дихлорэтано (0,1—0,2%-ный) наливают в высокий цилиндр и на 10 мин погружают в него предметное стекло так, чтобы только $1/5$ часть его находилась над поверхностью раствора. Затем стекло вынимают и держат над цилиндром до тех пор, пока не стечет избыток раствора (обычно 5—10 мин), просушивают на воздухе 5—10 мин и снимают пленку описанным выше способом.

Если исследуемый объект необходимо окрасить или обработать кислотами и щелочами, применяют углеродные пленки, которые можно считать универсальными. На чистое шлифованное предметное стекло в вакууме напыляют углерод, пропуская электрический ток между графитовыми стержнями. На стекле образуется тонкая пленка, которую снимают описанным выше способом.

Полученные любым способом пленки-подложки переносят на специальные сетки, или бленды, изготовленные из чистой меди или морской бронзы, с 4—10 ячейками на 1 мм. Сетки могут быть плетеными

из тонкой проволоки или электролитическими, т. е. изготовленными фотохимическим способом; их диаметр составляет 2—3 мм. Все виды сеток обычно имеются в лабораториях в готовом виде, в противном случае их изготавливают с помощью специальных пробойников. При исследованиях ультратонких срезов используют сетки с ячейками (4—6 ячеек на 1 мм).

II.3.2.1. РАЗМЕЩЕНИЕ ПЛЕНОК-ПОДЛОЖЕК НА СЕТКАХ

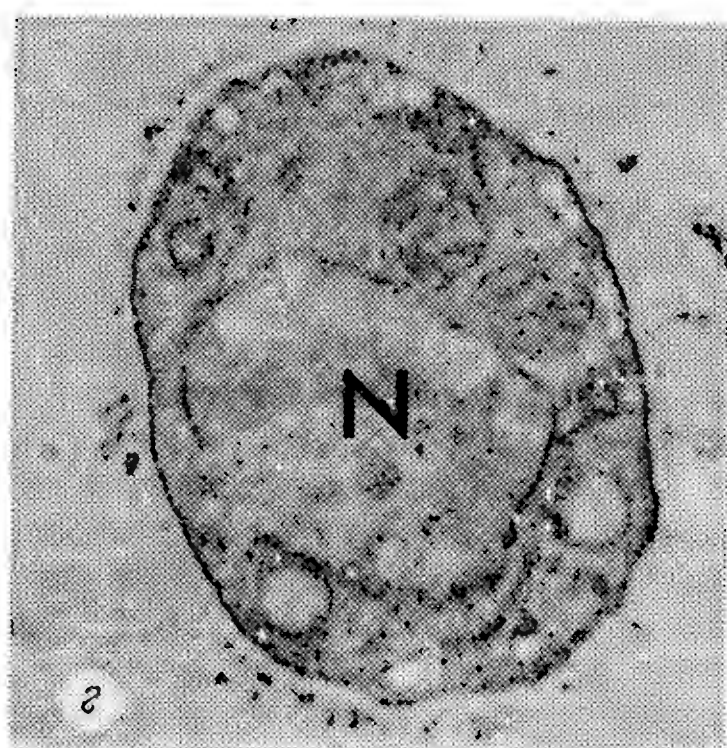
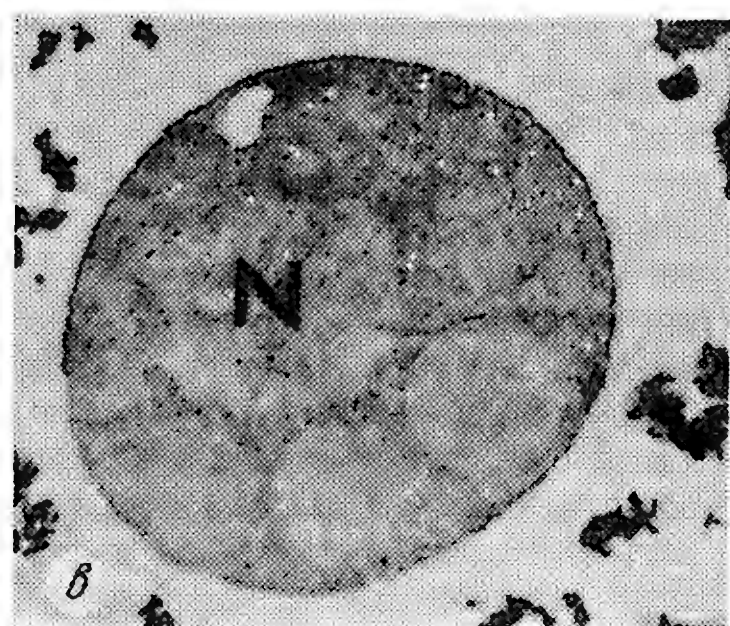
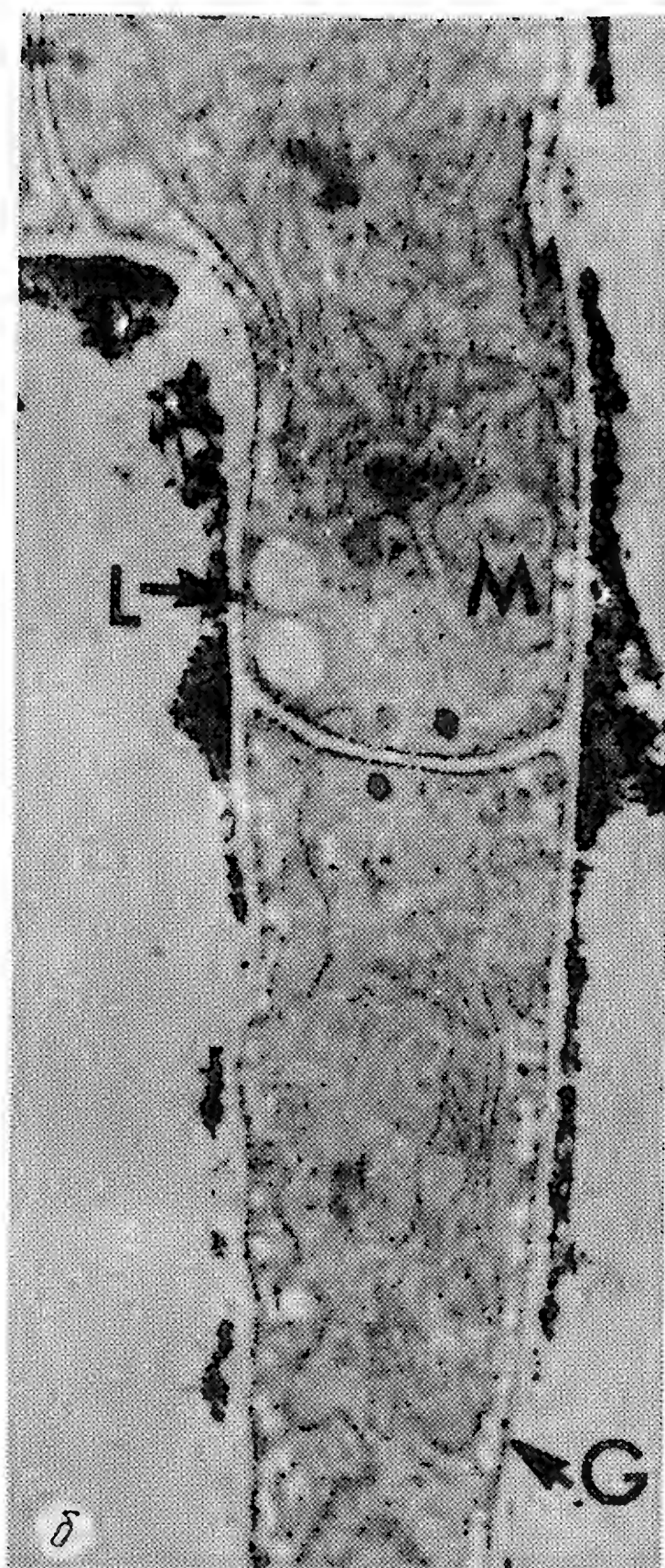
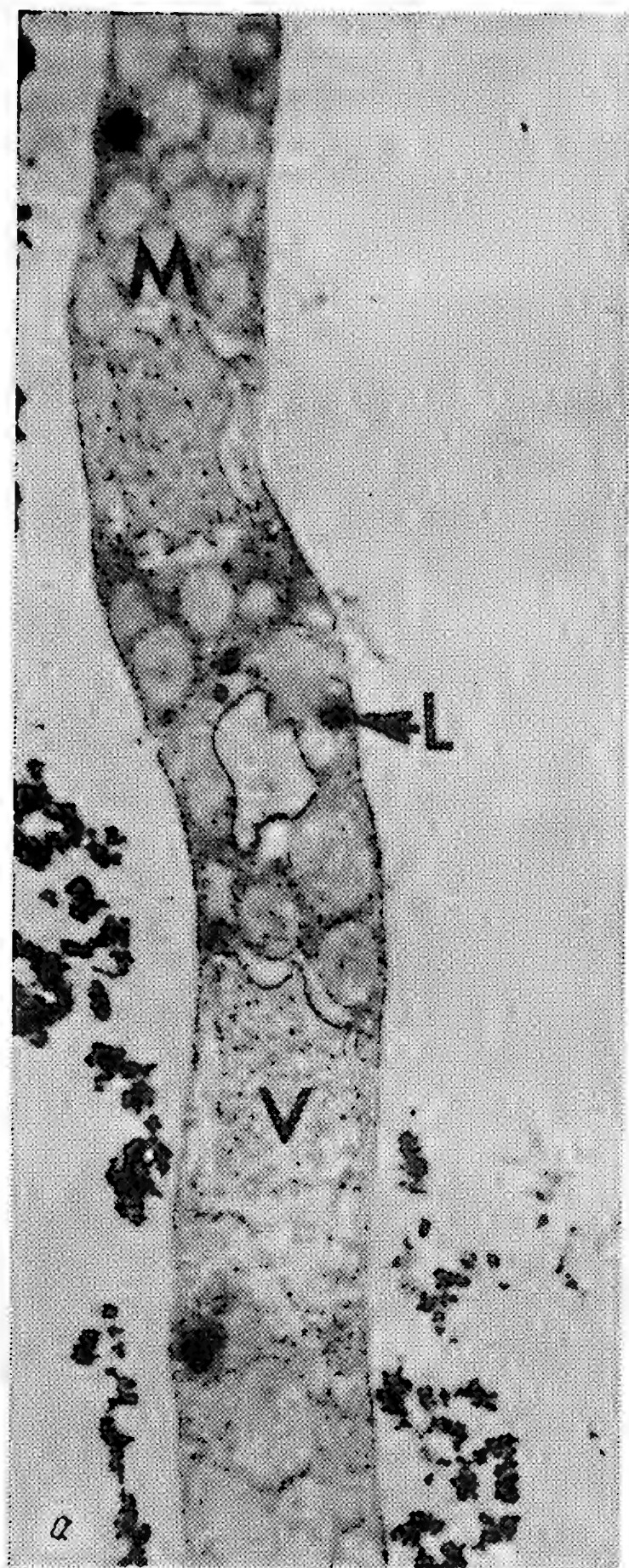
1. Метод круглой петли и столбиков. В чашку Петри наливают дистиллированную воду до образования выпуклого мениска, опускают в воду пленку и пинцетом помещают на нее нужное количество сеточек. Круглую проволочную петлю диаметром 0,3—0,7 см подводят под водой так, чтобы в центре петли находилась сеточка на пленке. Препаровальной иглой обрезают пленку вокруг сеточки по окружности петли, пленку с сеточкой переносят на специальный пьедестал со столбиком. Петлю переворачивают вниз ручкой и одевают на столбик так, чтобы сетка оказалась под пленкой. Столбик вынимают пинцетом из гнезда, освобождают петлю и снова ставят на прежнее место. Пленку с сеточкой высушивают на воздухе при комнатной температуре и используют для изготовления препаратов.

Сетки, нанесенные на пленку, можно вынуть из воды и с помощью предметного стекла. Для этого стекло ставят наклонно к поверхности пленки и нажимают им постепенно на пленку, погружая ее в воду таким образом, чтобы пленка равномерно прилипала к стеклу и сеточки оказывались заключенными между пленкой и стеклом. Стекло вынимают из воды, препаровальной иглой обрезают вокруг сеточек пленку и убирают со стекла пинцетом. Подсушивают и используют для приготовления препаратов.

2. Другой широко распространенный способ получения сеток с пленкой заключается в следующем: на дно сосуда диаметром около 20 см с вмонтированным в дно краном (типа делительной воронки) опускают пластинку или предметное стекло с расположенными на нем сеточками; затем сосуд наполняют дистиллированной водой. Пленку получают либо описанным выше методом, либо на поверхность воды помещают готовую пленку и постепенно выпускают из сосуда воду. Вместе с водой пленка опускается на сеточки, накрывает их и прилегает настолько плотно, что сеточки присасываются к пленке. Стекло с сеточками и пленкой вынимают, разрезают на участки, подсушивают и используют описанный выше способ.

II.3.2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУСПЕНЗИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования целых клеток гиф и конидий готовят их суспензию и очищают ее от посторонних примесей, так как суспензия должна быть максимально однородной. При исследовании вегетативных или спороносных органов грибов, выращенных в любых условиях, с поверхности колонии или плодового тела микологическим крючком осторожно снимают верхний слой клеток. Во время соскребания крючок должен легко скользить по поверхности спороношения, чуть прикасаясь к нему. Для получения суспензий из колоний, выросших на твердой среде, делают их смыв дистиллированной водой или физиологическим раствором, а полученную суспензию центрифугируют



10—15 мин при $n = 500—800$ об/мин и разделяют полученные фракции, которые исследуют в зависимости от цели опыта [402, 453, 460].

Иногда суспензию предварительно подвергают капельному диализу. В чашку Петри наливают дистиллированную воду и на ее поверхности помещают коллодиевую пленку. После испарения эфира на пленку помещают капли исследуемой суспензии и оставляют для диализа на 4—6 ч. Соли из суспензии диффундируют в дистиллированную воду, а более крупные частицы разрушенных тканей оседают на пленке. Потом из этой капли пастеровской пипеткой осторожно отбирают самый верхний слой и переносят на сетку с пленкой.

Для сохранения объекта перед центрифугированием его фиксируют формалином или осмием. Обычно применяют нейтральный формалин (40%-ный водный раствор формальдегида), который добавляют к получаемой суспензии из расчета 0,5—1,0 мл на 100 мл суспензии. Время фиксации 1—2 сут, так как после кратковременной фиксации объект разрушается при дальнейшей обработке и промывках. Ткани, фиксированные формалином, заметно разбухают при заливке в метакрилаты, поэтому рекомендуется дополнительная фиксация четырехокисью осмия. Для этого ткани после фиксации в формалине и промывки выдерживают 1—2 ч в 1%-ном незабуференном растворе четырехокси осмия.

Из осмиевых фиксаторов наиболее распространен универсальный *фиксатор Паладе*, который готовят следующим образом. В бюкс, стоящий на льду, сливают приготовленные заранее растворы в определенном порядке: 0,28 М раствор ацетата натрия (0,5 мл), 0,28 М раствор натрийвероната (мединала, 0,5 мл), 0,1%-ный раствор соляной кислоты (1,0 мл), 2%-ный раствор четырехокси осмия (2,5 мл). рН раствора не должно превышать 8,0 (лучше 7,6); значения рН регулируют в зависимости от заданного уровня, добавляя несколько капель натрийвероната или соляной кислоты. Все растворы готовят на бидистиллированной воде и хранят в темной посуде в холодильнике. Исходный раствор четырехокси осмия готовят так: в химически чистую склянку наливают нужное количество бидистиллированной воды и вносят в нее предварительно приготовленный фиксаж OsO_4 .

Т а б л и ц а 3. Состав
цитрат-фосфатных буферных
растворов Мак-Ильвейна

рН	Компоненты буфера, мл	
	Лимонная кислота 0,1 М (21,008 г/л моногидрата)	Фосфат на- трия двузаме- щенный 0,2 М (35,65 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$ $\times 2\text{H}_2\text{O}$)
7,0	3,53	16,47
7,2	2,61	17,39
7,4	1,83	18,17
7,6	1,27	18,73
7,8	0,85	19,15
8,0	0,55	19,45

Рис. 51. Строение гиф *Penicillium* sp., выращенного на неопептоне глубинным способом:

a — продольный срез через гифу, фиксированную OsO_4 ($\times 15000$; деление на снимке соответствует 0,66 мкм); *b* — продольный срез через гифу, фиксированную перманганатом ($\times 15000$; деление на снимке соответствует 0,45 мкм); *в* — поперечный срез через гифу, фиксированную OsO_4 ($\times 15000$; деление на снимке соответствует 0,45 мкм); *г* — поперечный срез через гифу, фиксированную перманганатом ($\times 15000$; деление на снимке соответствует 0,5 мкм). М — митохондрии; N — ядра; L — жировые тельца; G — гранулы полисахаридов.

Полученный раствор должен иметь желтоватый оттенок и быть совершенно прозрачным. Раствор стабилизируют хромовым ангидридом из расчета один кристалл величиной с булавочную головку на 150 мл забуференного раствора. Стандартные буферные растворы получают при сливании растворов лимонной кислоты определенной концентрации и двузамещенного фосфата натрия (табл. 3).

Фосфат натрия перед растворением выдерживают в течение 2 сут при 37° С, при этом содержание воды в нем уменьшается до 2 молекул, поскольку в продажном реактиве их количество обычно больше.

Фиксацию в парах осмия применяют, если объект насыщен влагой и объем его не достигает 1 мм³. В небольшой бюкс наливают 2—4%-ный незабуференный раствор четырехоксида осмия. На предметное стекло наносят каплю взвеси с объектом так, чтобы жидкость равномерно распределялась по стеклу, не стекая с него; переворачивают стекло объектом вниз и плотно накрывают им бюкс с раствором. Время фиксации зависит от объекта — срезы гиф и различных субстратов с ними фиксируют 1—3 ч, конидии — 20—30 мин. Температура фиксации — комнатная.

Фиксатор Клофилда используют для фиксации тканей, пораженных грибами, поскольку фиксатор Паладе гипотоничен. Для этого готовят буфер из расчета: 14,7 г натрийвероната (мединала), 9,7 г ацетата натрия, до 500 мм бидистиллированной воды. Для приготовления фиксатора берут одну часть буфера (из расчета нужного для работы объема раствора), одну часть 0,1 н. соляной кислоты, две части бидистиллированной воды, четыре части 2%-ного раствора четырехоксида осмия и добавляют 0,015 г сахарозы на каждый миллилитр фиксатора. Значение рН доводят до 7,4, используя при этом буфер или 0,1 н. соляную кислоту.

Фиксацию методом Лафта применяют при изучении тонкого строения клеточных структур изолированных оболочек клеток, ядер, митохондрий, различных эндоплазматических структур [215]. Отдельно готовят 1—2%-ный раствор перманганата калия, который хранят в темной посуде с притертой пробкой в холодильнике, и раствор буфера: в 100 мл бидистиллированной воды растворяют 1,88 г натрийвероната и 1,15 г ацетата натрия. Сливают равные части раствора перманганата калия и буфера, доводят рН фиксатора до 7,2—7,6. Время фиксации препаратов от 15 мин до нескольких часов при температуре около 0° С. При более высокой температуре препарат разрушается вследствие сильного и быстрого окисления (рис. 51).

Фиксация перманганатом калия. Для фиксации клеток из культур грибов, выращенных погруженным способом или на агаризованных средах, а потом отцентрифугированных, применяют 1,5%-ный раствор перманганата калия. Значение рН фиксатора зависит от объекта: виды *Fusarium* лучше фиксируются при рН 7,4; *Neurospora* — 7,6; *Puccinia* — 6,5—7,2; дрожжи *Rhodotorula* и *Saccharomyces* — 4,5. Время фиксации 0,5—1 ч при температуре 4° С.

После фиксации любым способом препараты должны быть отмыты от фиксатора. Четырехокись осмия и перманганат калия отмывают нейтральным буфером, дважды разбавленным дистиллированной водой с такой же концентрацией натрия или сахарозы, которая использовалась при фиксации. В качестве промывочных сред для других фиксаторов применяют растворы, в которых фиксировались объекты без фиксатора или же какие-либо растворы, содержащие NaCl в такой же концентрации, как в фиксирующем растворе. Время отмывки около 5 мин, при температуре, равной температуре фиксации. Многие

исследователи предпочитают промывать препарат в спирте, концентрация которого равна начальной в ряду концентраций спиртов, используемых для обезвоживания.

II.3.2.3. ВЫСУШИВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Препараты, подготовленные к электронно-микроскопическим исследованиям, должны быть абсолютно сухими. После фиксации их подсушивают при комнатной температуре или при 26—28° С в термостате, а затем обезвоживают в ряде спиртов с возрастающей концентрацией вплоть до абсолютного спирта. Можно пользоваться этиловым, метиловым спиртами, а также ацетоном. В каждом конкретном случае подбирают оптимальные условия обработки материала.

II.3.2.4. НАПЫЛЕНИЕ ОБЪЕКТОВ

Для повышения контрастности препаратов их напыляют, т. е. покрывают тонким слоем хрома, золота, платины, палладия, урана или других металлов, подбирая напылитель в зависимости от объекта. При исследовании грибов, как правило, применяют платину или



Рис. 52. Поверхность одноклеточной конидии *Fusarium moniliforme* (× 2000, препарат приготовлен методом платино-углеродных реплик).

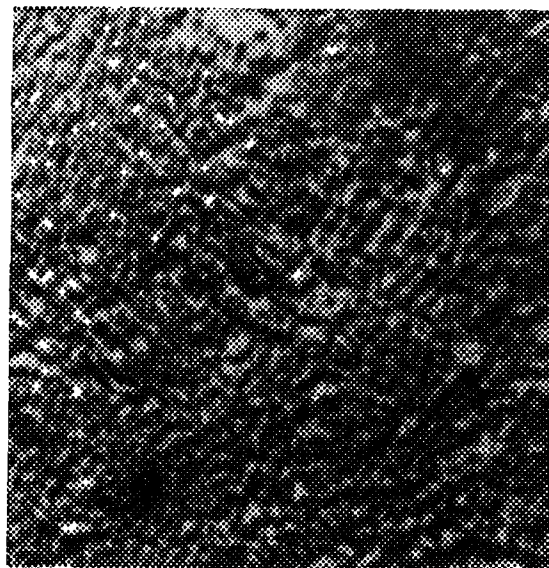


Рис. 53. Микроструктура верхнего слоя гифы *Fusarium moniliforme* (× 6200; препарат приготовлен методом платино-углеродных реплик).

Рис. 54. Поверхность двухклеточной конидии *Fusarium culmorum* (× 3500; препарат приготовлен методом платино-углеродных реплик).



палладий, которые наносят очень тонким слоем. При напылении золотом и хромом получается крупнозернистое изображение, затрудняющее исследование тонких структур, требующих больших увеличений. В настоящее время наилучшим напылителем считают уран. При исследовании грибов в качестве напылителей используют также

осмиевую кислоту, азотнокислый лантан, фосфорномолибденовую кислоту, фосфорновольфрамовую кислоту, уксуснокислый уран и другие соли тяжелых металлов. Напыление производят в специальных приборах (рис. 52—54).

II.3.2.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕЗОВ НА УЛЬТРАМИКРОТОМЕ

Для микротомирования препарат специально обрабатывают (для получения блоков), обезвоживают, пропитывают и заливают метакрилатами (*n*-бутилметакрилатом или *n*-метилметакрилатом), которые легко проникают в различные ткани и клетки, хотя иногда искажают вид отдельных структур. Метакрилаты ядовиты, поэтому с ними работают под вытяжкой; хранят на холоду в темном месте. Для заливки пригодны лишь метакрилаты без примеси гидрохинона (ингибитор) [64, 167].

Хорошие ультратонкие срезы получают при использовании блоков, твердость которых соответствует твердости объекта. Твердость полимеров метакрилата можно регулировать, добавляя к *n*-бутилметакрилату *n*-метилметакрилат (обычно в соотношении 4 : 1). Если готовят препараты тонких гиф, соотношение *n*-бутил- и *n*-метилметакрилатов составляет 9 : 1. Катализатором полимеризации служит 2%-ный спиртовой раствор перекиси бензоила, который хранят в темноте, а перед употреблением тщательно высушивают на фильтровальной бумаге в эксикаторе или термостате при 37° С в течение 15—30 мин. После добавления перекиси бензоила раствор полимеризуется при комнатной температуре, но этот процесс длится несколько суток. Поэтому обычно полимеризацию проводят в термостатах при температуре 45—60° С в течение 12—18 ч. Последовательность заливки объектов: после обезвоживания сливают последнюю порцию спирта и в тот же сосуд добавляют смесь для полимеризации — сначала пропитывают чистыми метакрилатами, затем метакрилатами с перекисью бензоила и меняют эти растворы каждые 30 мин. После этого объекты помещают в желатиновые капсулы № 1 или 2 (диаметрами 5 или 6,5 мм), доверху наполненные смесью метакрилатов с перекисью бензоила. Капсулы закрывают крышками, помещают в стойки и ставят в термостат. После окончания полимеризации капсулы извлекают из термостата, с них снимают крышки, верхние части блоков отрезают лезвием и выбрасывают, так как они обычно плохо полимеризованы. На блоках делают необходимые надписи специальными чернилами (2 г танина, 30 мл воды, 1 г фуксина и 30 мл 36%-ного спирта), складывают и микротомуют.

II.3.2.6. МЕТОД ОТПЕЧАТКОВ ПФИСТЕРЕРА

На предметное стекло наносят каплю стерильной воды, вносят в нее соскоб из спороношений с незначительным количеством спор и оставляют на 3—5 ч для набухания (препараты некоторых видов грибов помещают в термостат). После испарения воды препарат подсушивают на воздухе, лучше всего на батарее, но не на пламени, так как в этом случае можно пережечь содержимое спор. На пластинки ацетобутирата толщиной не больше 0,2 мм, вымоченные в смеси 70%-ного спирта и ацетона (10 : 3), переносят разбухшие и подсушенные споры и прессуют их в течение 1—3 мин до полного высыхания пластинки. Помещают пластинку со спорами в струю воды и осторожно промывают мягкой кисточкой. Пластинку подсушивают и напыляют кварцем перпендикулярно

ее плоскости, покрывают слоем растопленного парафина толщиной 1 мм для предохранения препарата от повреждения при отмывании ацетобутирата. Затем растворяют ацетобутиратовую пластинку в метилацетате так, чтобы остался только участок с отпечатками спор, покрытый кварцем и парафином. Парафин растворяют в толуоле до полного исчезновения. Кварцевый отпечаток, даже если он разломан, переносят на сетки, подтягивают металлом, как обычно, и просматривают.

II.3.3. ИЗУЧЕНИЕ ГРИБОВ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ

Вырезают фрагмент листа или другого органа растения, поврежденного грибом, толщиной не более 1 мм² и помещают в пробирку или маленький бюкс с фиксирующей жидкостью (обычно 5%-ный водный раствор ТХУ). Это быстрый фиксатор, поэтому сразу можно приступить к промыванию дистиллированной водой, меняя ее трижды в течение часа. Промытые кусочки ткани переносят для обезвоживания последовательно в 70-, 95- и 100%-ный спирт и выдерживают в каждом из них до 1 ч. Спирт наливают в широкие бюксы с крышками, а материал помещают в стеклянные цилиндрики с дном из ткани, которые переносят из бюкса в бюкс. После обезвоживания препарат переносят в смесь абсолютного спирта и метакрилатов (1 : 1) на 1 ч, а затем в смесь бутилметакрилата и метилметакрилата (4 : 1) с добавлением 1%-ного раствора перекиси бензоила. Далее все выполняют по методике, описанной в разделе II.3.2.5.

III. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

III.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Культивирование (выращивание) микроскопических грибов в зависимости от целей и методов исследования включает ряд этапов. Так, при изучении распространения грибов разных таксономических групп с учетом их морфологии и физиологии необходимо: 1) подготовить образцы естественных субстратов (почву, солому, подстилку, зерно и т. д.), из которых предполагается сделать высев на обычные (сусловый агар) и элективные, обеспечивающие преимущественное развитие одного вида или группы родственных видов, среды для определения наличия грибов и характера их роста; 2) выделить и получить чистые культуры грибов на плотных питательных средах; 3) пересеять чистые культуры на дифференциально-диагностические среды для последующего определения их видовой принадлежности.

Культивирование микроскопических грибов с целью накопления биомассы или определенных продуктов метаболизма предполагает: 1) наличие чистой высокопродуктивной культуры; 2) подготовку стандартного посевного материала; 3) определение условий, необходимых для роста грибов и проявления их биосинтетической активности; 4) выбор условий ферментации, аппаратного оформления, контроля ферментации, подготовку и стерилизацию питательных сред.

III.2. УСЛОВИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РОСТА ГРИБОВ

Для роста грибов и проявления их биосинтетической активности необходимы источники питания — углерод, азот, водород, неорганические соединения, содержащие калий, натрий, фосфор, магний, кальций, серу и железо; микроэлементы — марганец, цинк, молибден, кобальт, медь, бор и др.; стимуляторы роста; оптимальные температура, влажность, степень аэрации, освещение и другие факторы. Источниками питания могут быть природные (естественные) питательные субстраты неопределенного состава и искусственные питательные среды строго определенного состава, содержащие необходимые элементы в усвояемой форме. В качестве питательных субстратов используют кусочки овощей, плодов, мелко нарезанные ветви и стебли растений, зерно в натуральном виде или в виде экстрактов, настоек или отваров (пивное сусло, дрожжевая вода, кукурузный экстракт, картофельный экстракт), добавляемых к искусственным питательным средам.

Питательные вещества усваиваются микробами только при определенной кислотности питательной среды, так как проницаемость оболочки микробных клеток зависит от этого фактора. Большинство грибов развивается при рН 4,5—6,0. Реакция среды в процессе роста культуры грибов может значительно изменяться. Каждая стадия развития гриба (прорастание спор, вегетативное развитие мицелия, спорообразование) требует определенных значений рН. Для некоторых видов характерны два оптимума кислотности. Оптимальные значения рН среды могут изменяться для одного и того же вида гриба как в сторону подкисления, так и в сторону подщелачивания в зависимости от источников питания [314].

Не меньшее значение для роста грибов имеет температура выращивания. Температурный оптимум определяется видовыми свойствами грибов и условиями культивирования. Минимальная температура для развития грибов 0—5° С. Оптимальная — для видов рода *Penicillium* 25—30° С, для видов рода *Aspergillus* и *Fusarium* 30—35° С.

Для хорошего прорастания спор и развития мицелия гриба необходима определенная влажность среды. Так, при выращивании *Asp. oryzae* на пшеничных отрубях оптимальна 65%-ная влажность, *Asp. niger*, *Asp. awamori* и других — 58—60%-ная. При более высокой влажности среды развитие грибов прекращается.

Рост грибов зависит также от условий освещения. При недостаточном освещении наблюдается задержка спорообразования. Прямые солнечные лучи отрицательно влияют на рост грибов и их активность при длительном хранении.

III.2.1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

При выборе подходящей для культивирования гриба среды следует учитывать, что один и тот же гриб для роста и накопления требуемого метаболита часто нуждается в разных средах. По консистенции различают жидкие и плотные среды. Плотные среды готовят, добавляя к растворам солей агар-агар (2—2,5%) или желатин (10—15%), а в случае необходимости увлажняют поверхность твердых предметов (опилки и т. п.) растворами питательных веществ.

Плотные среды употребляют для выделения грибов из естественных субстратов, получения культур из отдельных спор, определения количества спор и особенностей спорообразования, дифференциации грибов по характеру роста на плотных средах, изучения влияния света и температуры на рост грибов и влияния различных мутагенных факторов при селекционных исследованиях и т. д.

Сыпучие среды (зерно, отруби) используют для приготовления больших количеств спорового посевного материала.

Жидкие питательные среды применяют для качественного и количественного изучения потребностей грибов в питательных веществах в процессах роста и синтеза метаболитов. В жидких питательных средах определяют влияние рН-среды, микроэлементов, стимуляторов, ингибиторов и других веществ на биосинтетическую активность исследуемого гриба.

Одна из наиболее распространенных сред для выделения и культивирования грибов — среда Чапека и ее модификации. Состав этой среды можно менять в широких пределах в зависимости от физиологических особенностей культивируемого гриба. Например, при выращивании мукоральных грибов сахарозу заменяют глюкозой или

Т а б л и ц а 4. Характеристика факторов роста микроорганизмов [179]

Вещество	Устойчивость к нагреванию в слабокислой среде	Светочувствительность	Концентрация, мг/л	
			минимальная	оптимальная
Фолиевая кислота	—	+	0,00001	0,001
<i>n</i> -Аминобензойная кислота	++	—	0,00001	0,001
Биотин	++	—	0,00001	0,001—0,01
Тиамин	—	—	0,0001	0,01—0,1
Компоненты тиамина	+	—	0,001	0,01—0,1
Пиридоксин	+	+	0,0001	0,01—1,0
Са-пантотенат	—	—	0,005	0,05—1,0
Рибофлавин	—	+	0,005	0,05—1,0
Ниацин	++	—	0,01	0,1—1,0
β-Аланин	++	—	0,1	0,5—1,0
Холин	++	—	0,1	1,0—2,0
Инозит	++	—	1,0	3,0—6,0
Пуриновые и пиримидиновые основания	+	—	1,0	5,0—10,0

другим источником углерода, азотнокислый натрий — азотнокислым аммонием, а при выращивании витаминзависимых форм добавляют немного картофельного отвара [28]. Для подкисления сред употребляют соляную, серную, лимонную, молочную и фосфорную кислоты, для подщелачивания — щелочь (NaOH).

Для усиления роста грибов и повышения их биосинтетической активности в питательные среды вводят микроэлементы. Железо, цинк, марганец применяют в растворенном виде. Для приготовления раствора этих элементов, содержащего 0,1 мг Fe^{3+} , 0,1 мг Zn^{2+} и 0,05 мг Mn^{2+} в 1 мл, 723,5 мг $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 439,8 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 203,0 мг $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 600 мл дистиллированной воды, добавляют химически чистую серную кислоту до получения прозрачного раствора и доводят объем раствора до 1 л дистиллированной водой. На 1 л питательной среды берут 2 мл этого раствора [263]. Используют также растворы микроэлементов, приготовленные следующим образом: 100 мкг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 880 мкг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 40 мкг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 15 мкг $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 10 мкг $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 5 мкг $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 л питательной среды вносят 1 мл этого раствора [792].

В качестве факторов роста используют тиамин, биотин, реже инозит, пиридоксин и др. Часто готовят исходные растворы этих соединений в 20%-ном спирте и хранят в холодильнике. Исходные растворы тиамина и пиридоксина должны содержать 100 мкг/мл; биотина — 5 мкг/мл (так как биотин должен присутствовать в среде в concentra-

Т а б л и ц а 5. Содержание минеральных солей (г/л),
необходимое для нормального роста различных
микроорганизмов [179]

Соль	Бактерии	Грибы и актиномицеты
K_2HPO_4	0,2—0,5	1,0—2,0
KH_2PO_4	0,2—0,5	1,0—2,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1—0,2	0,2—0,5
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,005—0,01	0,02—0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005—0,01	0,05—0,2
Na_2MoO_4	0,001—0,005	0,01—0,02
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,02—0,1
$CoCl_2$	До 0,03	До 0,06
$CaCl_2$	0,01—0,03	0,02—0,1
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001—0,005	0,01—0,05

ции 5 мкг/л) [263]. На основании активности витаминов и витаминоподобных веществ установлена их дозировка в расчете на 1 л питательной среды (табл. 4).

В настоящее время известно множество синтетических и полусинтетических сред, различающихся главным образом источниками азота и углерода и их соотношением в среде. Так, вместо глюкозы могут быть использованы углеводороды. Для изучения биосинтетической активности грибов, как и других микроорганизмов, применяют так называемые недостаточные по тому или иному компоненту среды (например, магний (Mg)-, железо (Fe)-, углерод (C)-недостаточные). Использование таких сред позволяет выяснить роль отдельных компонентов среды в процессе метаболизма. Для нормального роста микроорганизмов необходимо определенное количество минеральных солей (табл. 5). Подбирая состав питательной среды, можно создать условия, благоприятные для развития одного вида гриба с определенной физиологической функцией и не пригодные для размножения других видов.

III.2.1.1. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

После смешения компонентов среды ее стерилизуют. Способ стерилизации зависит от состава среды.

Стерилизация насыщенным паром под давлением. В лабораторных условиях большинство сред стерилизуют в автоклаве одноразово паром при 1 атм [121° С] в течение 15—20 мин. Некоторые среды стерилизуют в более жестких условиях. Среда, содержащая глюкозу и другие сахара (при небольшом объеме), стерилизуют под давлением 0,5 атм (112° С) в течение 20—30 мин или текучим паром (100° С) в течение 1 ч (дву- или трехкратно) с интервалом в 20—24 ч. В производственных условиях растворы глюкозы и других сахаров, обладающие восстановительными свойствами, стерилизуют паром отдельно от других компонентов питательной среды. Условия стерилизации определяют по ряду показателей (табл. 6). В производственных условиях стерилизацию осуществляют в ферментерах. Длительность цикла стерили-

зации зависит от состава среды, конструкции ферментера и способа стерилизации. При больших емкостях ферментеров цикл стерилизации питательных сред длится от 1—1,5 до 6 ч. Такой способ стерилизации считается простым, дешевым и надежным.

Стерилизация сред фильтрованием через мелкопористые фильтры. Для осуществления этого метода широко применяются бактериологические фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, Беркефельда и мембранные фильтры. Фильтрующая способность их определяется размерами пор и степенью пористости. Метод холодной стерилизации применяется в тех случаях, когда среды не выдерживают нагревания (например, среды, содержащие белки).

Т а б л и ц а 6. Соотношение температуры насыщенного пара и давления при стерилизации питательных сред [357]

Давление, атм		Температура, °С
нормальное	добавочное	
1,0	—	100
1,0	0,5	112
1,0	1,0	121
1,0	1,5	128
1,0	2,0	134

Химическая стерилизация. Выявлена возможность стерилизации ферментационной среды перекисью водорода [518]. Особенно чувствительны к действию перекиси водорода дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Полная стерильность среды наступает после 7 ч выдерживания ее с 0,1%-ной перекисью водорода при 45°С; при 30° С время стерилизации составляет 24 ч. Изменение значений рН среды в определенных

пределах ($4 < \text{pH} < 8$) не влияет на результаты стерилизации. Грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*, устойчивые к перекиси водорода при 45°С, погибают при повышении температуры до 50°С.

Стерилизация с помощью антибиотиков. Этим методом пользуются в тех случаях, когда стремятся освободиться от одних групп микроорганизмов при сохранении других и для уменьшения обсемененности материала. Растворенный антибиотик вносят в среду с посевным материалом или непосредственно в ферментационную среду.

Среды можно стерилизовать также токами высокой частоты, ультразвуком, ИК-лучами.

III.3. ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НЕКОТОРЫХ ГРИБОВ [494]

Правильная подготовка посевного материала грибов — одно из важнейших условий их успешного культивирования с целью накопления биомассы или определенных продуктов метаболизма. Споровый посевной материал готовят на отрубях, дробленой кукурузе, просе, пшене, сушлом агаре и других субстратах. Для приготовления больших количеств посевного материала следует брать культуру гриба с хорошо выраженным спороношением, но не старую, так как старые споры имеют низкую жизнеспособность. Если культура не дает спороношения, то для посева используют механически измельченный (мацерированный) мицелий гриба.

Подготовка посевного материала должна проводиться в стерильных условиях, с соблюдением условий безопасности. Для обеспечения чистоты культуры помещение (бокс), предназначенное для подготовки

посевого материала, следует периодически тщательно мыть, а стены, пол, потолок и все оборудование обрабатывать 2%-ным водным раствором хлорамина, 5%-ным раствором пергидроля и другими дезинфицирующими средствами. Воздух стерилизуют бактерицидными лампами марки БУВ-15, БУВ-30 или БУВ-60 из расчета не менее 2—2,5 Вт потребляемой из сети мощности на 1 м³. Перед работой помещение облучают в течение 40—60 мин.

Для контроля чистоты воздуха в бокс на 10 мин ставят открытые чашки Петри с суловым и мясо-пептонным агаром, а затем помещают их в термостат для проращивания при температуре 25 и 37° С (3—5 сут). Посуда и среды, предназначенные для подготовки посевного материала, должны быть стерильными. Стеклянную посуду стерилизуют в автоклаве 1 ч при давлении 1 атм (121° С) или в сушильном шкафу 2 ч при 160° С. Способ стерилизации зависит от состава среды (см. III.2.1.1.).

III.3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ФЕРМЕНТАЦИИ "ТЕМПЕН" ВЫРАЩИВАНИЕМ RHIZOPUS OLIGOSPORUS НА РИСЕ

Посевной материал получают, выращивая *Rh. oligosporus* на распаренном рисе. Рис засевают спорами гриба так, чтобы концентрация их составляла 10⁵—10⁶ на 1 г. Споры прорастают в первый день инкубации, при этом зерна риса покрываются белым налетом мицелия. На второй день цвет мицелия меняется на светло-зеленый, так как начинается образование спорангиев. Влажность риса, составляющая в начале 67%, уменьшается до 5% в конце восьмого дня инкубации. Полученный продукт содержит 10⁸—10⁹ спор на 1 г. Далее его измельчают и используют как посевной материал [759].

III.3.2. ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГРИБНОГО СОЛОДА ИЗ КУЛЬТУРЫ ASPERGILLUS ORYZAE

В колбы емкостью 250 мл вносят по 10 г среды следующего состава: 10 г дробленой кукурузы, 100 г пшеничных отрубей и 60 мл 0,2 н.соляной кислоты, содержащей 0,62% ZnSO₄ · 7H₂O, 0,63% FeSO₄ · 7H₂O и 0,08% СиSO₄ · 5H₂O. После стерилизации и охлаждения среду засевают культурой *Asp. oryzae*, распределяя ее тонким слоем на дне или на боковой поверхности колбы, и выдерживают при 30° С. После того как спорообразование достигнет максимума, культуру быстро высушивают и хранят до употребления. Сухая споровая культура должна иметь зеленоватый, но не коричневый или черный цвет. Для засева влажных отрубей требуется около 1% такой культуры [372, 822].

III.3.3. ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ГРИБА DENDRODOSNIUM TOXICUM НА СОЛОМЕННОЙ СМЕСИ

Смесь готовят из равных количеств соломы клевера, люцерны, овса и помещают ее в пробирки или матрасы, заполняя 2/3 их объема. В каждую пробирку добавляют 2 мл водопроводной воды, а в матрас — 100 мл, закрывают ватными пробками и бумажными колпач-

ками. Приготовленный субстрат стерилизуют при 1,5 атм (127° С) в течение 30 мин трехкратно с интервалом в 20—24 ч. В простерилизованную и охлажденную среду засевают суспензию спор, смытых с 10-дневной культуры *Dendrodochium toxicum*, выращенной на сусловом агаре в пробирках или матрасах при температуре 27° С. Плотность посева — 5 мл густой взвеси спор на один матрас. Засеянную суспензию выращивают в термостате 30 дней при температуре 24—26° С. Полученный таким образом посевной материал после контроля используют для засева ферментационной среды. Срок годности посевного материала 3 мес.

III.3.4. ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ ИЗ КУЛЬТУРЫ *PENICILLIUM VITALE* PIDORL. ET BILAI (ШТАММ 1312/140 IV—V)

При определенных условиях культивирования *P. vitale* продуцирует внеклеточно глюкозооксидазу и каталазу. Конидии гриба *P. vitale* сохраняют во флаконах вместе с сухой стерильной черноземной почвой или в культуре на агаре в пробирках или матрасах, которые пересевают один раз в 6 мес. Конидии гриба хорошо сохраняются и в специальных флаконах емкостью 250 мл после выращивания на пшене и последующей лиофильной сушки.

Посевной материал гриба *P. vitale* готовят двумя способами: выращиванием продуцента на просе и на пшене. Сначала конидии высевают на сусловый агар, разлитый в пробирки или матрасы, и инкубируют при температуре 25° С в течение 30—40 дней. После проверки на чистоту посева (макроскопической, а в случае необходимости и микроскопической) полученную культуру высевают на стерилизованное просо или пшено.

III.3.4.1. ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА *P. VITALE* НА ПРОСЕ

В пробирки 20 × 2 см вносят по 8—10 г чистого сухого проса, закрывают их ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при давлении в 2 атм (134° С) в течение 20 мин. Сухое просо стерилизуют двукратно с интервалом в 20—24 ч. После второй стерилизации в пробирки добавляют стерильную водопроводную воду (60—80% массы проса) и снова стерилизуют. Сразу после последней стерилизации пробирки с просом встряхивают, охлаждают и засевают взвесью конидий в среде Билай. В каждую пробирку вносят по 1 мл взвеси конидий при концентрации их в среде $2 \cdot 10^6$ в 1 мл. Посев конидий можно проводить путем соскабливания их с агаровой культуры.

Гриб выращивают при температуре 24—25° С в течение 1 мес. Полученный посевной материал в дальнейшем хранят при комнатной температуре в сухом месте до посева. Срок годности культуры 1 год.

III.3.4.2. ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА *P. VITALE* НА ПШЕНЕ

Для получения посевного материала используют пшено высшего или первого сорта (предварительно определяют его влажность). Цельные зерна пшена помещают в кипящую водопроводную воду (соотношение воды и пшена 1 : 1 на сухую массу) и варят при помешивании в течение 15—20 мин. Полуразваренное зерно оставляют

на 15 — 20 мин в теплой упаковке, а затем переносят на пергаментную бумагу для остывания и на фильтровальную бумагу для подсушивания. В специальные флаконы емкостью 250 мл переносят по 10—15 г из расчета на сухую массу пшена. Флаконы закрывают ватными пробками, марлевыми и пергаментными колпачками и стерилизуют текучим паром (температура 100° С) в течение 30 мин, затем температуру повышают и стерилизуют при давлении 1 атм еще 30 мин. После стерилизации пшено охлаждают, встряхивают и вторично стерилизуют в том же режиме через 20 ч.

Для засева готовой среды можно использовать взвесь конидий 1-2-месячной культуры, выращенной на сусловом агаре, или суспензию конидий стандартного посевного материала, для чего в матрас или во флакон добавляют стерильную водопроводную воду из такого расчета, чтобы полученная суспензия содержала $(2 - 3) \cdot 10^5$ конидий в 1 мл. Для засева среды берут 0,5 — 1 мл суспензии на флакон.

После засева конидий флакон закрывают ватной пробкой, встряхивают для равномерного распределения культуры в питательном субстрате и помещают в термостат на 7—10 сут (24—25° С) до получения хорошего равномерного роста и спороношения. Во время роста культуру периодически встряхивают.

Выросшую культуру подвергают непрерывной вакуумной сушке при температуре не выше 28° С в течение 48—72 ч до достижения постоянной массы. Убыль влаги определяют ежедневным взвешиванием. После высушивания горлышко флакона с посевным материалом парафинируют и покрывают пергаментным колпачком. К каждому флакону прилагается этикетка, на которой указывается наименование штамма, номер паспорта и партии, дата выпуска, срок годности. Приготовленный таким образом посевной материал хранят при комнатной температуре и нормальной влажности. Срок годности посевного материала — 1 год с момента посева конидий на субстрат.

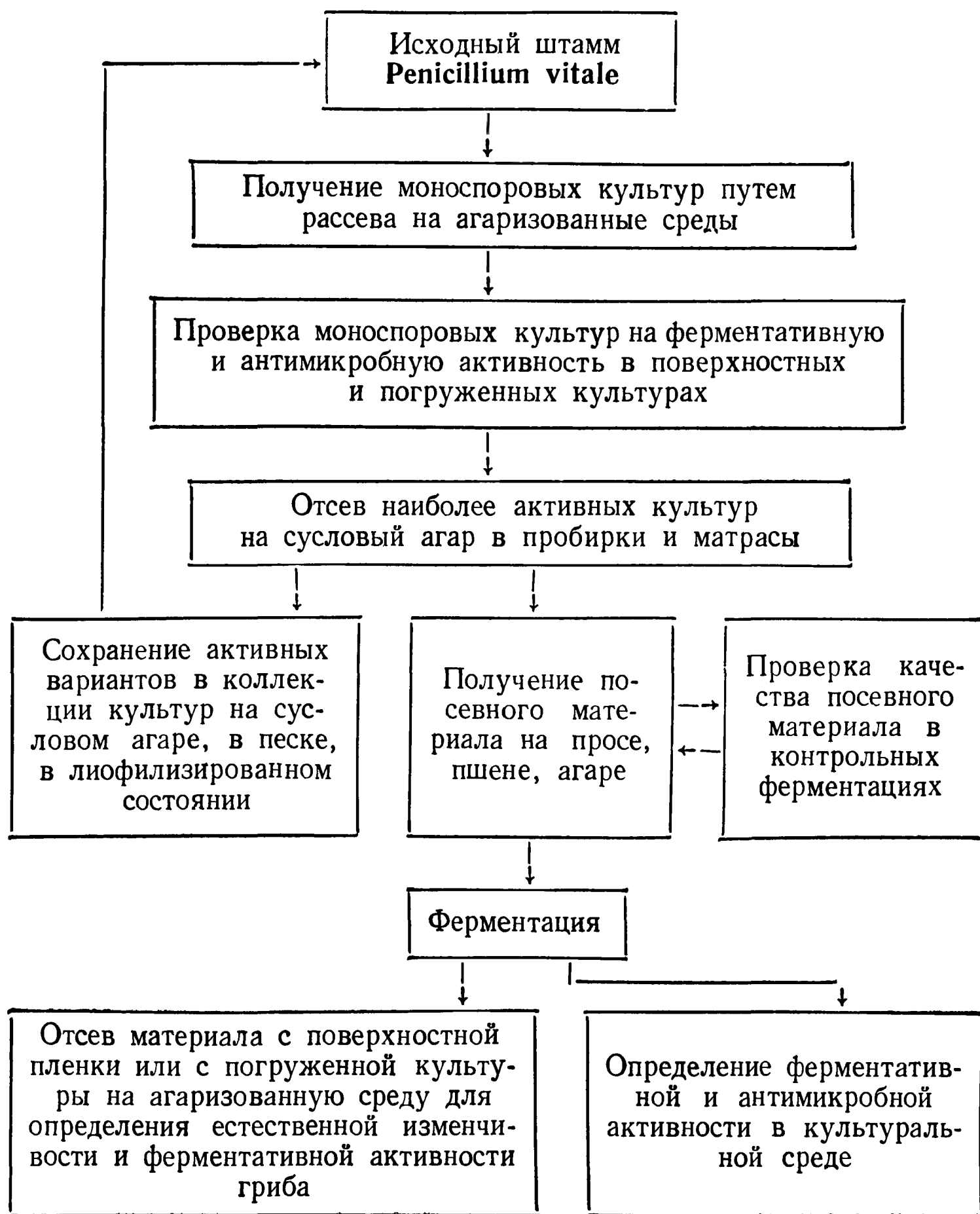
Посевной материал *P. vitale* Pidopl. et Bilai (штамм 1312/140) имеет вид крупинок зеленого цвета, свободно перемещающихся при встряхивании флакона. Во флаконе содержится около 10—15 млрд. конидий. Всхожесть конидий должна быть не ниже 80%. Ее определяют путем выращивания гриба в колбах емкостью 0,75 л, содержащих 120 мл среды Билай, после 12—15 ч ферментации на качалках при 240 об/мин. Всхожесть подсчитывают в счетной камере и выражают в процентах.

В посевном материале должна отсутствовать посторонняя микрофлора. Чистоту посевного материала проверяют засевом на бульон и агар Хоттингера или МПА и МПБ с 0,5% глюкозы и инкубацией при температуре 37° С до 4 сут. Для исключения загрязнения дрожжами или другими грибами его высевают на сусловый агар или среду Чапека и инкубируют при температуре 25 и 37° С не менее 5 сут.

Морфология, характерная для данного штамма: колонии на агаре Чапека с сахарозой сначала белые, затем зелено-голубые, бархатистые, покрытые желтоватыми мелкими каплями, складчатые, с довольно широким белым краем, впоследствии приобретающие грязно-сероватый оттенок. Обратная сторона колонии сначала соломенно-желтая, затем желто-коричневая. Агар окрашивается в зеленоватый цвет.

Активность посевного материала определяют контрольной ферментацией по регламенту. Для этой цели 2% флаконов из партии посевного материала подвергают ферментации (после 43—46 ч ферментации в колбах емкостью 0,75 л, содержащих 200 мл среды, рН инокулюма составляет 6,8—7,5, глюкозооксидазная активность отсутствует,

**Схема ведения культуры *Penicillium vitale*—
продуцента глюкозооксидазы и каталазы [329]**



каталазная активность достигает 35—50 ед./мл). При засеве культурой ферментационной среды Билай из расчета 4—6% после 72 ч ферментации при прочих оптимальных условиях культивирования, рН культуральной жидкости составляет не менее 3,4—3,6, глюкозооксидазная активность 40—50 ед./мл и выше, каталазная активность 4—12 ед./мл [324, 327].

Разработанная схема ведения культуры *P. vitale* — продуцента глюкозооксидазы и каталазы позволяет длительное время сохранять достигнутый уровень ее ферментативной активности не только в лабораторных, но и в промышленных условиях [326, 329].

III.3.5. СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Грибы рода *Aspergillus* являются активными продуцентами биологически активных веществ. Разработано несколько способов получения посевного материала. Схемы приготовления посевного материала *Asp. terreus* и *Asp. niger* (штамм ЭУ-119) для промышленного получения итаконовой и лимонной кислот приведены на рис. 55 и 56 [193—195]. Разработан также способ приготовления посевного материала других грибов рода *Aspergillus* и проведены исследования по сохранению свойств культур в виде сухих конидий, смеси сухих конидий с активированным углем и лиофилизированных конидий [101].

Рис. 55. Схема приготовления посевного материала *Asp. terreus*:

1 — исходная культура; 2 — посев в чашки Петри (50 шт.); 3 — отбор самой активной и однородной культуры; 4 — созревание культуры в кюветах площадью 3,3 дм²; 5 — сушка под вакуумом; 6, 7 — консервирование на активированном угле.

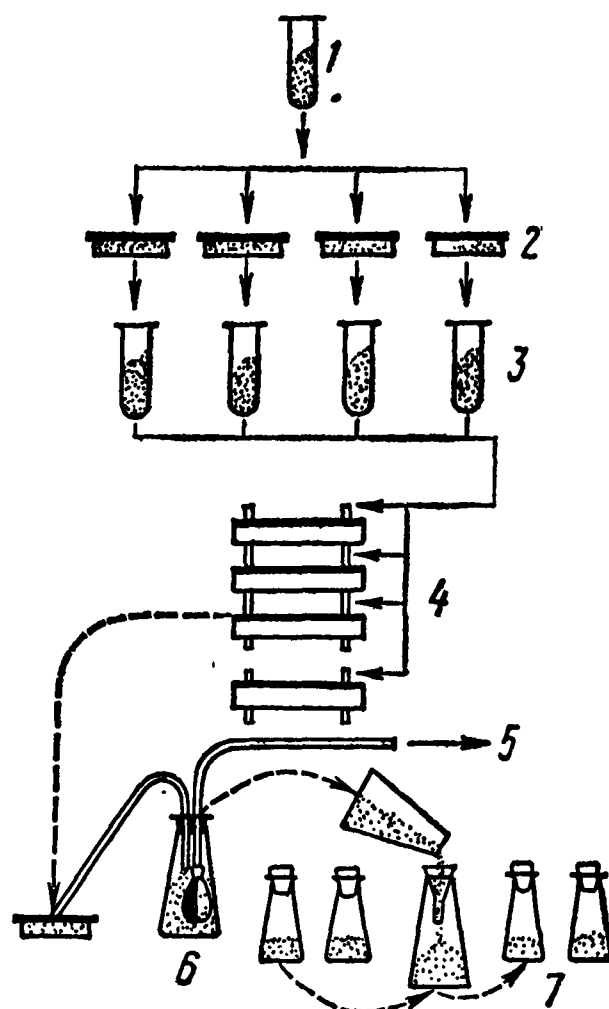
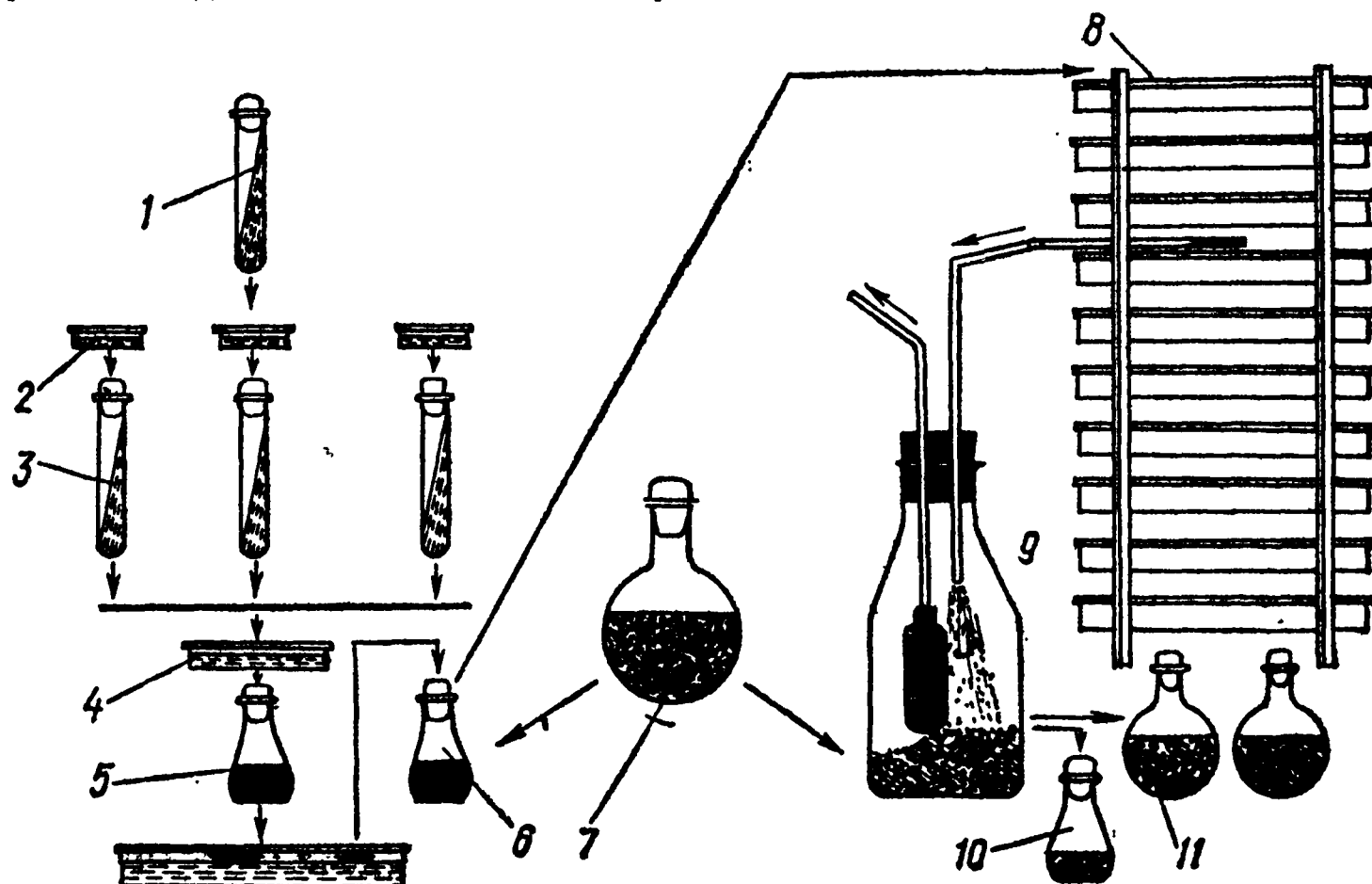


Рис. 56. Схема культивирования и приготовления посевного материала *Asp. niger* ЭУ-119 [195, 196]:

1 — исходная культура; 2 — посев в чашки Петри; 3 — отбор самой активной и однородной культуры; 4 — пересев в алюминиевые кюветы; 5 — консервирование конидий; 6 — конидии первой стадии размножения; 7 — консервирование на активированном угле; 8 — посев конидий в кюветы для размножения; 9 — конидии второй стадии размножения; 10 — средняя проба конидий; 11 — посевной материал.



Для длительного хранения культур рода *Aspergillus* — продуцентов глюкоамилазы — наиболее пригодны методы лиофилизации и пересева культуры каждые 3 мес на специально подобранные среды [44].

Разработан способ получения посевного материала для погруженного культивирования *Asp. awamori* (штамм 16) методом поверхностного культивирования на твердых питательных средах [91].

III.3.6. КОНТРОЛЬ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Посевной материал каждой партии подвергают контролю на чистоту и однородность культуры (микробиологический контроль), биосинтетическую способность (биохимический контроль), а также на всхожесть и энергию прорастания спор при проверке его пригодности для производственных целей. Для контроля из каждой партии посевного материала отбирают 2% проб партии.

III.3.6.1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

При микробиологическом контроле устанавливают чистоту и морфологическую однородность посевного материала. Для этого посевной материал засевают на бульон и агар Хоттингера или МПБ с 0,5% глюкозы и МПА и инкубируют 2—3 сут при температуре 37° С.

Для выявления возможного загрязнения дрожжами или другими грибами производят посев культуры на сусловый агар или среду Чапека с последующей инкубацией в течение 5 сут при температуре 25 и 37° С.

Посевной материал перед посевом разводят стерильной водопроводной водой так, чтобы при последующем высеве в чашке Петри выросло не более 40—50 колоний. По истечении срока инкубации оценивают качество посевного материала (макроскопически, а в случае необходимости и микроскопически).

III.3.6.2. БИОХИМИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Методы биохимического контроля посевного материала зависят от биосинтетической способности исследуемого продуцента и могут резко отличаться друг от друга. Обычно проводят контрольную ферментацию культуры в оптимальных условиях; затем в культуральной жидкости или экстрактах мицелия определяют антибиотическую, ферментативную или другие активности.

III.3.6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВСХОЖЕСТИ СПОР

На предметном стекле с помощью специальных колец готовят влажную камеру. Споры проращивают в висячей капле профильтрованной и простерилизованной среды. Для посева споровую суспензию разводят так, чтобы в капле было не более 10—15 конидий.

Время выращивания конидий при оптимальной температуре составляет 10—15 ч. После этого конидии просматривают под микроскопом. Общее количество просмотренных конидий в каждой партии посевного материала составляет 400—500. Подсчетом устанавливают количество проросших и непроросших конидий.

Всхожесть — это отношение проросших конидий к общему количеству просмотренных, выраженное в процентах. Всхожесть должна быть не ниже 80%. Во время хранения всхожесть спор может снижаться, поэтому необходимо периодически проверять всхожесть посевного материала.

III.3.7. ХРАНЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Пробирки и флаконы с готовым посевным материалом хранят в сухом чистом помещении при относительной влажности воздуха не более 70% и температуре воздуха 5—20° С. Допускаемое колебание температуры — не более 5° С. Посевной материал следует предохранять от действия прямых солнечных лучей.

III.4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ

Выбор метода культивирования зависит от цели исследования. Условно все методы можно разделить на две большие группы: 1) поверхностное (стационарные культуры); 2) погруженное, или глубинное, которое включает: а) периодическое (прерывное, статическое) и б) непрерывное (непрерывнопроточное, динамическое). Различные варианты этих методов отличаются аппаратным оформлением и условиями культивирования.

III.4.1. ПОВЕРХНОСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Методы поверхностного культивирования заключаются в выращивании грибов на плотных неагаризованных средах (семенах злаковых растений, отрубях, древесных стружках или опилках и др.), на стандартных агаризованных средах, разлитых в пробирки, чашки Петри, матрасы, кюветы и т. п., на жидких питательных средах, разлитых в колбы, матрасы и флаконы различной емкости.

Техника посева зависит от консистенции питательной среды, качества высеваемого материала и цели исследования.

III.4.1.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ПЛОТНЫХ НЕАГАРИЗОВАННЫХ СРЕДАХ

Семена злаковых растений, отруби, овсяная крупа, овощи (картофель, свекла) и другие естественные продукты являются прекрасным питательным субстратом для выращивания грибов, позволяющим создать оптимальные условия для их роста. Семена риса, сорго, арахиса, пшеницы, проса, размельченной кукурузы в количестве 10—100 г помещают в пробирки, колбы, матрасы и увлажняют водой (количество воды зависит от вида семян). Так, для получения афлатоксина из *Aspergillus flavus* на 50 г семян арахиса добавляют 12 мл воды, на такую же навеску сорго, пшеницы, риса — 15, кукурузы — 36, соевых бобов — 18 мл [615]. Вместе с водой можно вносить дополнительные питательные вещества. Например, для получения афлатоксина из культуры *Asp. flavus* (штамм NRRL 3145) на зерне пшеницы и овса к 100 г семян пшеницы и овса добавляют 50 мл воды и оставляют в колбах Эрленмейера емкостью 300 мл при комнатной температуре на ночь для набухания. Затем содержимое колб стерилизуют 20 мин (121° С),

охлаждают и засевают суспензией спор из расчета 0,5 мл на 25 г (споры смывают 6 мл воды с семидневной культуры, выращенной на сусловом агаре при 25° С). После инокуляции культуру выращивают на качалке при 200 об/мин (28° С) в течение 3 сут. Каждые 24—48 ч в колбы добавляют стерильную воду из расчета 1 мл на 25 г зерна. На 4-е сут культуру обрабатывают паром. Целые зерна овса, овсяную крупу и шелуху овса (по 50 г) помещают в колбы Эрленмейера емкостью 300 мл и обрабатывают водой так же, как пшеницу. Субстрат инокулируют дубликатом суспензии (0,5 мл на 25 г субстрата). Колбы помещают на качалку; добавляют воду через 24, 48, 72 ч; на 6-е сут культуру обрабатывают паром [782].

Для культивирования грибов на отрубях, широко применяемого с целью получения ряда протеолитических, амилалитических и других ферментов, используют крупнолопастные пшеничные отруби, содержащие не менее 20% крахмала с начальной влажностью среды 58—65%.

При культивировании *Asp. oryzae* на отрубях в кюветах пшеничные или рисовые отруби увлажняют и пропаривают 1—2 ч для растворения крахмала и разрушения микроорганизмов, после чего охлаждают до 25—30° С. Охлажденный субстрат засевают спорами определенного штамма *Asp. oryzae* (около 0,5% при пересчете на сухую массу субстрата) и хорошо перемешанную массу раскладывают в кюветы (желательно с двойным дном) слоем толщиной около 3,75 см и инкубируют при оптимальной для роста гриба температуре (около 30° С). Необходимо поддерживать достаточное увлажнение для предотвращения высыхания отрубей, а также создавать достаточную вентиляцию для обеспечения доступа кислорода и удаления углекислоты. Через 40—48 ч в массе отрубей накапливается большое количество фермента. Продукт высушивают при температуре не выше 40° С, пока влажность не снизится до 8% (это предупреждает развитие бактерий), или экстрагируют водой (из расчета 1—2 объема на каждый объем продукта) и фильтруют [372].

При выращивании *Asp. oryzae* наблюдается три периода роста: первый — набухание и прорастание конидий, сопровождающиеся охлаждением среды (для создания благоприятных условий окружающей воздух необходимо подогревать); второй (через 12 — 20 ч от момента засева) — интенсивный рост мицелия, характеризующийся быстрым повышением температуры до 37—47° С (растущую культуру нужно охлаждать); третий (36—40 ч от момента засева) — прекращение роста гриба, сопровождающееся снижением температуры ниже 30° С [489].

При культивировании грибов на отрубях их засевают спорами и помещают в горизонтально вращающиеся барабаны разной емкости, через которые медленно продувают воздух, нагретый до 30° (но не выше 35° С). В период прорастания спор барабан приводят в движение каждые 2 ч на 15—20 мин, а затем вращают непрерывно 40—54 ч со скоростью не более 1 об/мин. Постоянное перемешивание среды и аэрация предотвращают слишком сильное нагревание культуры, обусловленное выделением тепла при окислении углеводов и других питательных веществ [450].

Для промышленного получения ферментов разработаны технологические режимы культивирования грибов на отрубях. Для высева большого количества спор пользуются пневматическими распылителями, которые обеспечивают равномерное распределение спор на большой поверхности. Грибы выращивают в кюветах, которые после заполнения направляют в растительные камеры с постоянным режимом.

При культивировании грибов на инертных пористых материалах

(древесных стружках или опилках) последние помещают в матрасы, колбы, кюветы, цилиндрические сосуды и стерилизуют. Стерильный субстрат насыщают стерильным питательным раствором, засевают соответствующей культурой и выращивают ее при оптимальной температуре. В процессе роста во избежание чрезмерного высыхания субстрат периодически увлажняют.

При культивировании в цилиндрических сосудах тонкая струя среды непрерывно смачивает поверхность субстрата и, стекая вниз, проходит через всю его толщу, покрытую грибом, т. е. среда в течение всего периода культивирования постоянно контактирует с грибом. Жидкость, насыщенная продуктами метаболизма, по мере накопления выводится через отверстие, расположенное в нижней части сосуда. Струя стерильного воздуха, направленная кверху, постоянно аэрирует среду. Цель метода — получить рост гриба на поверхности субстрата [450].

III.4.1.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА СТАНДАРТНЫХ АГАРИЗОВАННЫХ СРЕДАХ

При посеве из пробирки в пробирку на твердые и жидкие среды обе пробирки (с культурой гриба и стерильной питательной средой) берут в левую руку на ладонь параллельно расположению пальцев и придерживают большим пальцем так, чтобы скошенная поверхность среды была хорошо видна. В правую руку (как писчее перо) берут микологический крючок и несколько раз проводят его над пламенем горелки для стерилизации, затем мизинцем и безымянным пальцем правой руки вынимают пробку из пробирки и осторожно вводят крючок в питательную среду по стенке пробирки для полного охлаждения. После этого крючок переносят в пробирку с культурой и движением от себя берут на его конец небольшое количество культуры в виде конидий или кусочка мицелия и переносят двумя уколами в свободную питательную среду так, чтобы один укол был ближе ко дну пробирки, а второй, — ближе к поверхности на 1—1,5 см. Края пробирок и пробки проводят через пламя горелки и плотно закрывают. На пробирке с посевом делают необходимые надписи стеклографом или прикрепляют этикетку резиновым кольцом, помещают их в металлические или картонные коробки вертикально и переносят в термостатную комнату для выращивания (рис. 57).

При пересеве с твердой питательной среды на жидкую крючок с конидиями или мицелием погружают в питательную среду и слегка встряхивают; остальные процессы идентичны описанным выше.

При пересеве с жидкой питательной среды на жидкую с пленки на поверхности среды осторожно снимают крючком кусочек мицелия или небольшое количество конидий и переносят в глубину стерильной питательной среды или на ее поверхность.

Посев гриба из пробирки в чашку Петри проводят а) на поверхность застывшей питательной среды; б) в стерильную чашку без среды, если засеваемый материал находится в расплавленной и охлажденной до 45—46° С агаризованной среде (рис. 58). В первом случае стерильную чашку Петри (10×10 см) помещают на стол вблизи пламени газовой горелки, осторожно приоткрывают крышку пальцами левой руки, вносят правой рукой 15—20 мл расплавленной агаризованной среды и опускают крышку. После застывания среды (а в случае необходимости — ее подсушивания) на поверхность среды засевают культуру гриба одним или несколькими уколами микологического крючка. Крышку

чашки во время работы не снимают, а только слегка приподнимают, предотвращая таким образом загрязнение среды посторонней микрофлорой. Во избежание рассеивания спор по всей поверхности чашки, когда необходимо получить рост в виде отдельных колоний, рекомендуется перед посевом чашку со средой перевернуть крышкой вниз, осторожно приподнять вверх дно чашки и уколom снизу произвести посев в центр чашки. После посева осторожно опускают дно чашки на крышку и в таком положении переносят в термостат, предварительно сделав отметку на дне чашки о виде культуры и дате посева. Микологический крючок обязательно

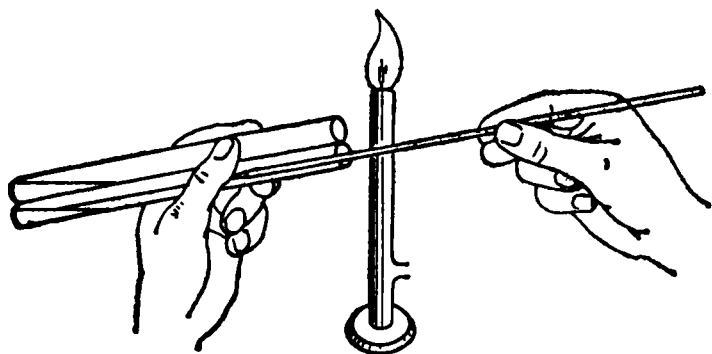


Рис. 57. Посев из пробирки в пробирку.

но сделав отметку на дне чашки о виде культуры и дате посева. Микологический крючок обязательно

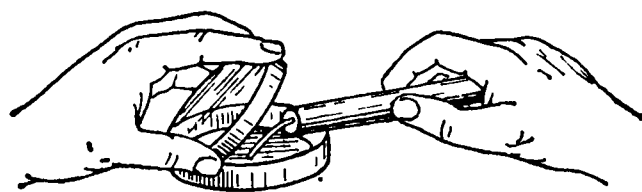


Рис. 58. Разлив агар в чашку Петри.

прокаливают перед взятием материала и после посева для уничтожения остатков посевного материала.

Во втором случае агаризованную среду, разлитую по флаконам или колбам, расплавляют на водяной бане или в автоклаве и охлаждают до 45°C . В охлажденную стерильную среду вносят конидии гриба микологическим крючком (повторяя эту манипуляцию 3-4 раза) или взвесь конидий в стерильной водопроводной воде пипеткой из расчета 0,5 — 1,0 мл на 100 мл среды. Тщательно перемешивают засеваемый материал со средой и по 15—20 мл смеси быстро переносят в чашки Петри (во избежание преждевременного застывания среды). После того как среда застынет, чашки переносят в термостат для выращивания гриба. Можно строго определенный объем взвеси конидий (0,1—1 мл) внести пипеткой в стерильную чашку Петри, а затем влить в нее 15—20 мл расплавленной и охлажденной до $40\text{—}50^{\circ}\text{C}$ агаризованной среды и равномерно распределить по дну чашки.

В настоящее время разработан аппарат для стерильного автоматического заполнения чашек Петри средой (рис. 59), который обеспечивает не только автоматизированный разлив среды, но и автоматизацию всего цикла (подачу чашек, снятие с них крышек, внесение среды и т. д.).

Первичный посев исследуемого материала производят обычно в чашках Петри, при этом пользуются петлей, микологическим крючком или пипеткой в зависимости от консистенции материала.

Возможны два варианта посева на плотную питательную среду в матрасы: а) на застывшую среду; б) в расплавленную и охлажденную до $40\text{—}45^{\circ}\text{C}$ агаризованную среду. В первом случае в матрасы разливают по 150—200 мл среды, стерилизуют и кладут матрас с еще не застывшей средой так, чтобы она покрыла всю широкую боковую поверхность матраса, не касаясь ватной пробки. После застывания среды, соблюдая правила стерильности, над пламенем газовой горелки в матрас на поверхность застывшей среды вводят пипеткой 5—10 мл культуры гриба и равномерно распределяют ее, покачивая матрас. Засеянные матрасы оставляют на некоторое время для лучшего впитывания в среду внесенной культуры и затем переносят в термостат.

Во втором случае разлитую по флаконам и колбам среду после расплавления и охлаждения засевают культурой гриба, 100—200 мл среды переносят в стерильный матрас и распределяют равномерно вдоль его широкой боковой поверхности. После застывания среды матрас переносят в термостат.

Перед посевом в жидкую питательную среду в матрасы готовят взвесь конидий встряхиванием культуры гриба в стерильной водопроводной воде (на одну пробирку с культурой гриба, выращенной на просе

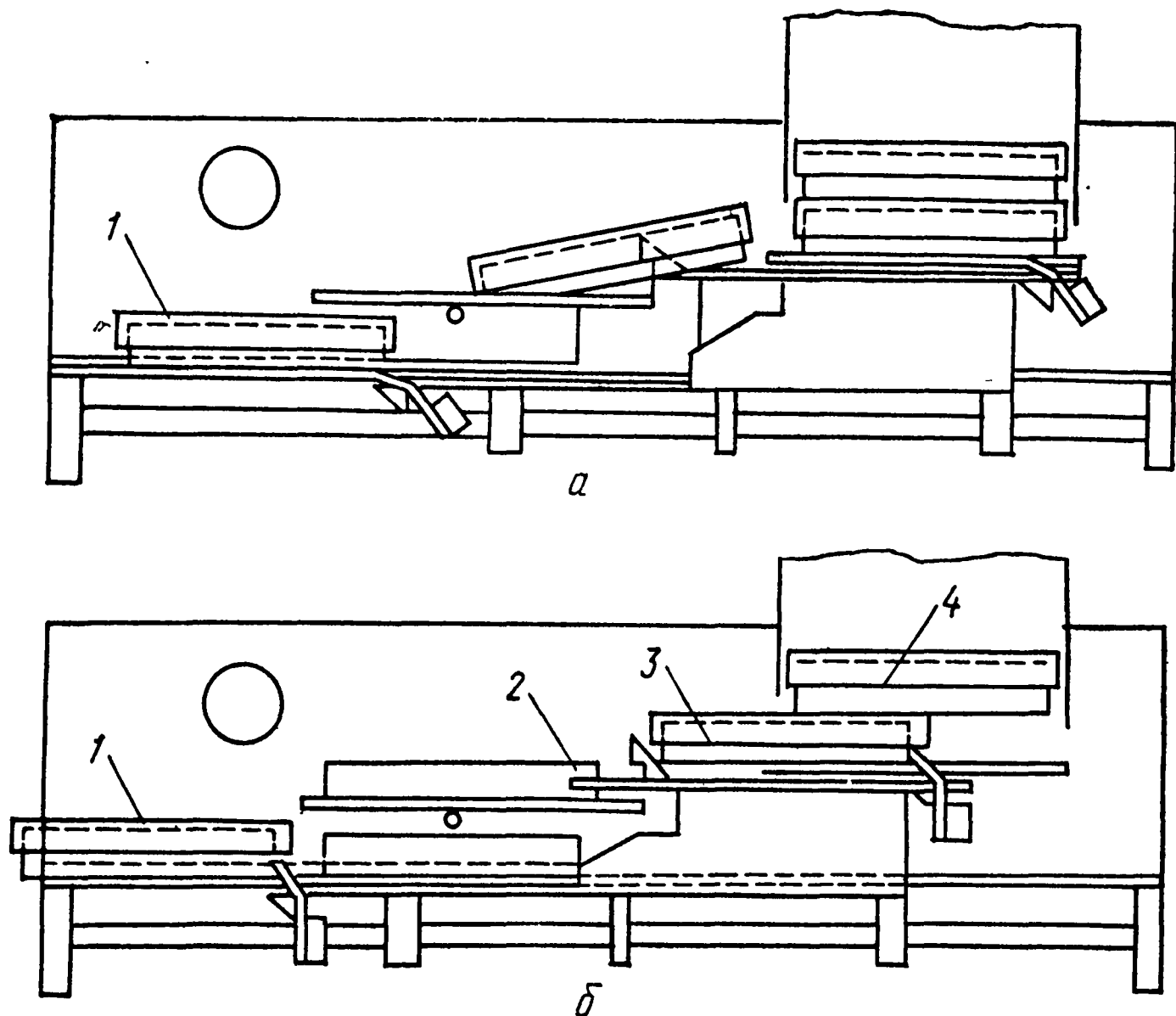


Рис. 59. Аппарат для разлива питательной среды в чашки Петри [48]: а — исходная позиция; б — чашка подана в разливочный узел и верхняя крышка (2) приподнята; 3, 4 — чашки, поступающие из бункера прибора; 1 — чашка, заполненная средой.

(8—10 г проса), добавляют 60—70 мл стерильной воды, на культуру гриба на косом агаре в обычной пробирке добавляют 5 мл стерильной воды) Подсчитывают количество конидий в 1 мл взвеси в счетной камере Предтеченского и засевают их в матрасы с 200—300 мл питательной среды или в большие бутылки, из которых в стерильных условиях разливают засеянную среду в матрасы в том же количестве. Чем тоньше слой среды, тем благоприятнее условия для окислительных процессов и накопления продуктов метаболизма. Матрасы помещают в термостат в слегка наклонном положении, чтобы пробка оставалась сухой.

Для культивирования мукоровых и гифальных грибов на твердых предварительно измельченных парафинах при наличии водной минеральной питательной среды используют виды с высоким температурным оптимумом (42—56° C) — *Aspergillus oryzae*, *Asp. niger*, *Mucor pusillus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*, *A. ramosa*, *M. hiemalis*,

M. racemosus, *M. circinelloides*. Для выращивания грибов используют минеральную среду Чапека (г): 2NaNO_3 ; $1\text{KH}_2\text{PO}_4$; $0,5\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,5\text{KCl}$; $10 \text{ мг } \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; до 1 л дистиллированной воды, pH среды 5,2. По 500 мл среды разливают в колбы Эрленмейера емкостью 0,75 л и стерилизуют при давлении 0,5 атм в течение 20 мин. После стерилизации в колбы над пламенем горелки добавляют отдельно перетопленный, взвешенный и измельченный до порошкообразного состояния парафин (4 г на 500 мл среды). Парафин вводят двумя порциями: во время посева грибов и на 2-3-й день культивирования. Среду засевают культурами, выращенными на сусловом агаре. Плотность посева $6 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^7$ конидий на 1 мл среды.

В зависимости от вида культивируемого гриба посевной материал выращивают в течение 48 ч при температуре 45; 52 и 56° С. Выращенный посевной материал переносят в ферментационные колбы из расчета 5—10% объема среды. В процессе ферментации в зависимости от требований, предъявляемых к получаемому продукту, можно регулировать уровень pH (который обычно повышают от 5,2—5,5 до 6,5—7,5) KOH, NaOH или аммиаком. Для ускорения процесса используют стимуляторы роста — дрожжевой автолизат, экстракт липидов и др.

Продолжительность культивирования 7—9 дней. После окончания ферментации культуральную жидкость с выращенным грибом центрифугируют для отделения неиспользованного парафина. Затем жидкость сливают, а мицелий промывают на капроновом фильтре водой, нагретой до 50—60° С. Для полного удаления парафина на фильтре мицелий промывают гексаном. Если при культивировании используют парафиновый гач, то промывать мицелий лучше метилэтилкетонем или метилазобутилкетонем.

При поверхностном культивировании по 300 мл среды разливают в матрасы емкостью 1 л и добавляют по 3 г парафина. Плотность засева такая же, как и в предыдущем методе. Срок культивирования 5—7 дней [11].

III.4.2. ПОГРУЖЕННОЕ, ИЛИ ГЛУБИННОЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

При глубинном методе культивирования мицелий погружен в жидкую аэрируемую питательную среду на весь период ферментации. Глубина погружения различна (0—10 м) и зависит от массообмена, вызываемого аэрацией, конструкции мешалки и других факторов [489].

Погруженное культивирование имеет ряд преимуществ по сравнению с поверхностным: для мицелия, растущего в толще питательной среды, создаются одинаковые условия (химические, физические); механическое перемешивание среды и непрерывная аэрация способствуют росту мицелия и накоплению продуктов обмена, так как во встряхиваемых культурах растворение и скорость диффузии кислорода выше, чем в стационарных; сокращается срок ферментации и увеличивается количество получаемого продукта за счет увеличения объема жидкости и применения ферментеров различного типа, позволяющих регулировать ферментационный процесс. Глубинный метод экономичней, но требует специального дорогостоящего оборудования, определенных штаммов-продуцентов, специального сырья, большого количества стерильного воздуха. Погруженное культивирование грибов с целью получения желаемых метаболитов проходит в строго определенных

режимах, обусловливаемых физиологическими потребностями гриба, с соблюдением стерильности на всех этапах ферментационного процесса.

Известно несколько вариантов метода погруженного культивирования грибов (рис. 60).

1. Культивирование в колбах и сосудах, встряхиваемых на поступательной или вращательной качалке.

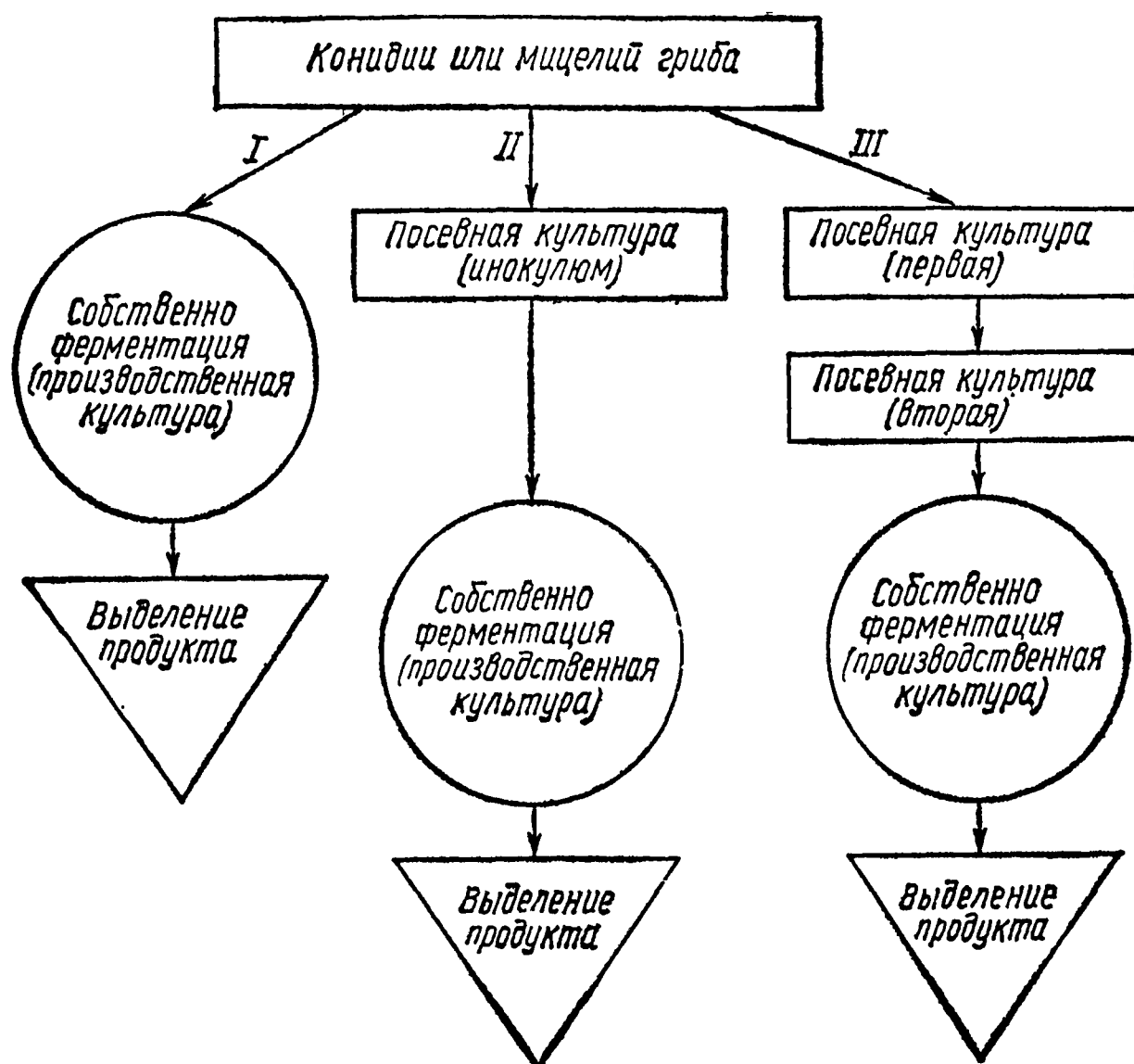


Рис. 60. Варианты погруженного культивирования грибов.

2. Культивирование в сосудах разной емкости с барботажем через среду воздуха без дополнительного механического перемешивания среды.

3. Культивирование с перемешиванием среды и барботажем через нее воздуха.

III.4.2.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ В СОСУДАХ, ВСТРЯХИВАЕМЫХ НА ПОСТУПАТЕЛЬНОЙ ИЛИ ВРАЩАТЕЛЬНОЙ КАЧАЛКЕ

Для культивирования этим методом применяют качалки разных систем с частотой качания 100—200 об/мин и больше. Существует несколько вариантов этого метода. В варианте I (см. рис. 60) процесс ферментации протекает в два этапа.

Подготовка суспензии спор. Из спорового посевного материала, выращенного на суловом агаре, просе, пшене или другом субстрате, после макроскопического (или микроскопического) исследования на чистоту и соответствующего контроля готовят суспензию спор. С этой целью в пробирки, матрасы или флаконы со споровым материалом вводят определенное количество стерильной воды или питательной среды и встряхивают в течение 10—15 мин. Суспензию переносят в

стерильную колбу, подсчитывают конидии в 1 мл среды и используют для дальнейшего посева. Подготовленный спорый материал можно засеивать непосредственно в жидкую питательную среду без дополнительного подсчета, если известно количество спор в определенном объеме флакона или пробирки.

Засев ферментационной среды и ведение процесса ферментации. В ферментационную среду, разлитую по 100—150 мл в колбы Эрленмейера емкостью 500—750 мл, засеивают суспензию спор в количестве, зависящем от цели опыта. Продолжительность ферментации 48—72—96 ч при заданной температуре.

В варианте II (см. рис. 60) процесс ферментации протекает в три этапа.

Подготовка суспензии спор. Осуществляется так же, как в варианте I.

Получение вегетативной посевной культуры. Колбы Эрленмейера емкостью 500—750 мл заполняют в зависимости от цели опыта 100—200 мл и более соответствующей питательной средой. После стерилизации и охлаждения среду засеивают определенным количеством полученной споровой суспензии и выращивают в течение 36—45 ч на вращательной или возвратно-поступательной качалке при заданной температуре.

Засев ферментационной среды и ведение процесса ферментации. Полученную таким образом вегетативную культуру пересеивают пипеткой (5—10% объема среды) в партию колб и выращивают в течение 48—96 ч в зависимости от цели опыта. При изучении метаболической активности грибов в лабораторных условиях процесс ферментации на этом обычно заканчивается и проводится анализ полученной культуральной жидкости и мицелия.

III.4.2.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ С БАРБОТАЖЕМ ЧЕРЕЗ СРЕДУ ВОЗДУХА БЕЗ МЕХАНИЧЕСКОГО ПЕРЕМЕШИВАНИЯ

Для культивирования этим методом применяют разные установки. Самая простая состоит из высокого цилиндрического сосуда, плотно закрытого резиновой пробкой с двумя трубками, одна из которых оканчивается у дна (для поступления стерильного воздуха), другая — над поверхностью раствора (для отвода воздуха). Стерильный воздух подается под давлением через трубку, опущенную до дна, и аэрирует среду, при этом не происходит равномерного перемешивания среды и часто в конце ферментации наблюдается усиленное склеивание мицелия гриба в крупные шарообразные конгломераты.

В более совершенных ферментерах трубка для входящего воздуха оканчивается резиновым или стеклянным кольцом с большим количеством мелких отверстий для распыления струи воздуха или соединена с пористым аэратором [489].

III.4.2.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ С БАРБОТАЖЕМ ЧЕРЕЗ СРЕДУ ВОЗДУХА И МЕХАНИЧЕСКИМ ПЕРЕМЕШИВАНИЕМ

Этот метод предполагает использование ферментеров различных конструкций и емкостей, с перемешивающими устройствами (мешалками) разных типов, разнообразными способами подачи воздуха и наличием регулирующих устройств, позволяющих следить за ходом ферментационного процесса (см. приложение 3).

В лабораторных условиях обычно используют ферментеры производства АН ЧССР, английской фирмы «Галленкамп» и аппараты АК-10 производства СКББП* АН СССР [477]; наиболее удобны колонные ферментеры емкостью 1—1000 л [544].

Этап подготовки посевной культуры аналогичен описаному в разделе III.3.4.2. Последующие этапы погруженного культивирования осуществляются по вариантам II и III (см. рис. 60). Первую генерацию вегетативной культуры (5—10% объема среды) переносят в лабораторный ферментер и весь процесс ферментации в зависимости от режима культивирования заканчивается в течение 72—120 ч (см. рис. 60, вариант II). Этот вариант обычно применяют в полупроизводственных условиях.

Первую генерацию вегетативной культуры снова переносят в колбы Эрленмейера для получения второй вегетативной генерации. После определенного периода выращивания (по достижении требуемой степени роста) вегетативную культуру переносят в инокулятор или посевной аппарат. Из посевного аппарата выросшая культура поступает в ферментер (см. рис. 60; вариант III). В производственных условиях инокуляторы содержат несколько десятков литров питательной среды, посевные аппараты — от нескольких сот до нескольких тысяч литров питательной среды, ферментеры — от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч литров ферментационной среды. Для примера опишем метод погруженного культивирования *Penicillium vitale* — продуцента ферментов глюкозооксидазы и каталазы.

Погруженное культивирование *P. vitale* осуществляется в две стадии: 1) выращивание вегетативного посевного материала (инокулюма), 2) собственно ферментация.

Получение инокулюма. Среда первая: 2% сахара; 0,2% KNO_3 ; 0,6% кукурузного экстракта (по сухой массе); pH 4,0—4,2.

Колбы емкостью 750 мл, содержащие 200 мл среды, засевают взвесью спор гриба из расчета $(0,6—1,2) \cdot 10^6$ конидий на 1 мл питательной среды. Для посева используют 4—8-месячную культуру. Колбы помещают на качалку (240—260 об/мин); температура культивирования 26—28° С, продолжительность — 36—44 ч. Уровень pH возрастает до 6,8—7,5. Глюкозооксидазная активность отсутствует, активность каталазы 40—50 ед./мл.

Собственно ферментация (или ведение процесса ферментации). Среда вторая: 8% сахара; 0,8% KNO_3 ; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% KCl ; 0,05% MgSO_4 ; 0,001% FeSO_4 ; pH 6,2—6,6. Стерильную ферментационную среду засевают вегетативным посевным материалом (4—8% объема среды). Ферментация осуществляется при 26—30° С, давлении 0,2—0,3 атм, непрерывном перемешивании среды мешалкой со скоростью 270—280 об/мин в течение 72—96 ч. Среду аэрируют дифференцированной подачей воздуха в ферментер по схеме, приведенной в табл. 7.

Состав полученной культуральной жидкости: 80—100 ед./мл глюкозооксидазы; 80—200 ед./мл каталазы; 1,5—2,2 г/100 мл среды сахаров (фруктоза); 1,5—2,2 г/100 мл среды глюконовой кислоты; pH 3,8—4,1.

При производственном получении глюкозооксидазы взвесь спор гриба вносят в инокулятор, вмещающий до 200 л питательной среды (коэффициент заполнения 0,6). Плотность посева $(0,6—1,2) \cdot 10^6$ конидий на 1 мл питательной среды. Температура выращивания 26—

* Специальное конструкторское бюро биологического приборостроения.

28° С, давление 0,2—0,3 атм. Аэрацию осуществляют из расчета 1 объем воздуха на 1 объем среды в минуту при непрерывном перемешивании среды мешалкой со скоростью 270—280 об/мин в течение 36—44 ч. Для получения больших количеств посевного материала культуру, выращенную в инокуляторе, переносят в посевной аппарат

Т а б л и ц а 7. Режим аэрации в динамике ферментации *Penicillium vitale*

Продолжительность ферментации, ч	Соотношение объемов воздуха и среды (за 1 мин)
1—6	1,5 : 1
6—18	2,2 : 1
18—24	2,0 : 1
24—36	1,7 : 1
36—48	2,0 : 1
48—64	2,2 : 1
64 — до окончания процесса	2,5 : 1

объемом 1—5 м³ на среду аналогичного состава. После культивирования в течение 20—24 ч при 26—28° С, давлении 0,2—0,3 атм и аэрации среды из расчета 1 объем воздуха на 1 объем среды в минуту посевной материал (4—8% объема среды) переносят в ферментер. Дальнейшая ферментация проходит так же, как описано выше [86, 249].

Разработаны методы направленного культивирования *P. vitale* для получения каталазы, которые осуществляются в две стадии на специально подобранных средах [326]. Показано, однако, что добавление к питательной среде 0,6% NaCl и двойного соединения глюкозы с NaCl в качестве источника углерода позволяет осуще-

ствить биосинтез каталазы в одну стадию без предварительного выращивания посевного материала [10].

Пеностатитель — подсолнечное масло: первая порция (0,05 — 0,1% объема среды) задается одновременно с посевным материалом, следующие порции (0,05%) вводят по мере образования пены в среде. При этом используют ферментер с соотношением диаметра и высоты 1 : 2,3, двухъярусную восьмилопастную мешалку (280 об/мин) с четырьмя отбойниками, установленными на $\frac{2}{3}$ высоты аппарата.

III.4.2.4. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ НАПРАВЛЕННОСТЬ ФЕРМЕНТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Известно, что регулируя состав среды, значение рН, температуру, аэрацию и скорость перемешивания можно ускорить процесс ферментации.

Температурный режим. Для создания необходимого температурного режима ферментеры помещают в термостатные комнаты, камеры и т. д., ферментеры небольшой емкости погружают в водяную баню или пропускают воду определенной температуры через рубашку ферментера. Обычно температура ферментации составляет 25—30° С.

Режим аэрации и скорость перемешивания. Направленность ферментационного процесса в значительной степени определяется режимом аэрации, причем не только скорость подачи воздуха, но и степенью его распыления. Чем меньше пузырьки воздуха, тем лучше аэрация. В то же время мелкие пузырьки воздуха вызывают образование пены. Для аэрации среды подается сухой стерильный воздух, очищенный в металлических фильтрах, заполненных стеклянной ватой или специальной тканью Петрянова, обеспечивающей биологическую стериль-

ность воздуха [223]. В последнее время получили распространение фильтры с особой гидрофобной и термоустойчивой тканью, которые полностью очищают воздух от бактерий [489]. Режим аэрации определяется целью ферментации. Например, при получении итаконовой кислоты скорость аэрации составляет $\frac{1}{8}$ объема воздуха в 1 мин на объем среды при давлении 0,7—1,4 атм [194].

Перемешивающие устройства. В лабораторной и производственной практике применяют различные устройства для равномерного перемешивания среды, отличающиеся конструктивными особенностями и скоростью вращения. Наиболее распространены двухъярусная турбинная мешалка, одно-, двух- и многоярусная лопастная мешалка (с 4—12 лопастями и скоростью вращения 120—200 об/мин), винтовое перемешивающее устройство со скоростью вращения до 900 об/мин.

Пенообразование и реагенты для борьбы с ним. Аэрация среды сопровождается пенообразованием, особенно интенсивным при реакции среды, близкой к нейтральной, когда воздух подается в виде мелких пузырьков. Пену можно разбивать, засасывая ее на дно ферментера и затем пропуская вверх через жидкость. Используют также жидкие пеногасители: минеральные масла, лярд, кукурузные и соевые масла, кашалотовый жир, октадеканол (раствор 0,75%-ного октадеканола в 95%-ном этаноле), гептадеканол, 10%-ный раствор полисилоксана. Выбор пеногасителя зависит от его свойств и стоимости [92]. Пеногасители могут подавлять процесс ферментации и влиять на качество получаемого продукта (например, применение химических пеногасителей противопоказано при получении продуктов питания). Наиболее удобными пеногасителями являются масла, которые дешевы и сами могут участвовать в обмене [438].

В лабораторных условиях пеногасители стерилизуют в пробирках или колбах отдельно от среды и, соблюдая стерильность, переносят в ферментер. В производственных условиях пеногаситель (масло, кашалотовый жир) стерилизуют нагреванием сухим паром в специальном аппарате, после стерилизации в этом же аппарате охлаждают до 30—32° С, затем сжатым стерильным воздухом подают в дозатор [223, 489].

III.4.2.5. КОНТРОЛЬ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАЦИИ

Пробы для анализа отбирают через определенные промежутки времени (3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 ч и т. д.) или по фазам роста гриба (стационарной, ускоренного роста, логарифмической), т. е. в периоды усиленного развития клеток в геометрической прогрессии, уменьшения скорости роста, отмирания или автолиза).

При выращивании грибов в пробирках или колбах на качалках для анализа чаще всего используют параллельные пробы. Это предотвращает вмешательство в условия выращивания и исключает возможность загрязнения. При выращивании грибов в ферментерах разной емкости для анализа берут пробы от 10 мл и более, соблюдая стерильность. Пробы анализируют по ряду показателей, основными из которых являются: характер роста гриба (визуальный и микроскопический анализ), прирост биомассы, рН среды, r_{H_2} , концентрация субстрата, количество растворенного кислорода, температура, специфическая активность культуральной жидкости и мицелия, чистота ведения процесса ферментации и другие показатели. На заводах с современным оборудованием контроль за процессом ферментации осуществляется автоматически [252, 411].

Несмотря на значительные преимущества, методы погруженного культивирования грибов все же не лишены недостатков — биосинтез грибов сопровождается быстрым увеличением числа клеток, интенсивным потреблением питательных веществ среды, накоплением продуктов метаболизма, которые тормозят дальнейший рост клеток и биосинтез желаемого продукта. В связи с этим в последнее время разработан метод непрерывного культивирования грибов, который позволяет длительное время поддерживать культуру в определенном состоянии и получать необходимый продукт. Более детально разработаны методы непрерывного культивирования для бактерий и дрожжей, некоторый опыт имеется и по культивированию микроскопических грибов.

III.4.3. НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *

Первые углубленные исследования по непрерывному культивированию микроорганизмов были проведены М. Д. Утенковым [440]. Непрерывное культивирование обеспечивает длительное состояние «физиологической молодости» культуры благодаря постоянному притоку свежей среды и удалению продуктов обмена. Изучение непрерывного культивирования микроорганизмов основывается на данных, полученных при периодическом культивировании (рис. 61).

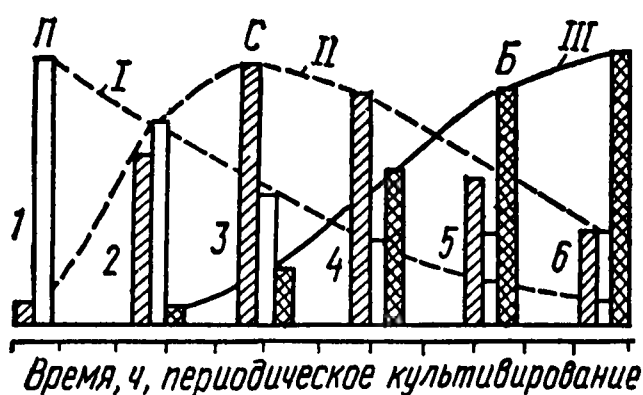


Рис. 61. Развитие культуры при непрерывном (1—6) и периодическом (I—III) методах культивирования;

П, С, Б — соответственно продукт, источник углерода, биомасса культуры [178].

П, С, Б — соответственно продукт, источник углерода, биомасса культуры [178].

Метод непрерывного культивирования микроорганизмов применяется как технологический прием ряда микробиологических процессов, осуществляемых на промышленной основе; для исследований закономерностей роста микробных популяций и влияния внешних факторов на физиологическое состояние микроорганизмов [376, 382].

Преимущества непрерывного культивирования: 1. Постоянный режим, исключая влияние времени. Культура может длительно находиться в определенной фазе роста, а следовательно, в физиологическом состоянии, необходимом для синтеза определенного

продукта. Это позволяет изучить влияние питательных веществ, температуры, рН, скорости перемешивания, аэрации и других условий на развитие культуры более детально, чем в обычных статических культурах, где условия постоянно изменяются.

2. Относительная однородность культуры, т. е. микробной популяции и ее продуктов.

3. Математическое выражение кинетики отдельных реакций, а значит, и всего процесса в целом проще и легче.

4. Возможна эффективная и направленная регуляция путем использования соответствующих приборов для культивирования и применения физических, физико-химических и других средств.

* Общая схема непрерывного культивирования микроорганизмов дана по материалам, изложенным в книге «Непрерывное культивирование микроорганизмов» (теоретические и методологические основы)/Под ред. И. Малека и З. Фенцля. — М.: Пищевая промышленность, 1968.

5. Возможности автоматизации процесса гораздо шире, чем при периодическом культивировании.

6. Метод экономичен и, как правило, эффективен, так как размеры аппаратуры могут быть уменьшены при той же мощности; исключены потери времени между отдельными циклами, которые неизбежны при периодической ферментации; культура развивается в наиболее эффективном физиологическом состоянии.

7. Стоимость оборудования несколько выше, чем при периодическом процессе, однако компенсируется непрерывной работой системы.

8. Приготовление среды и процессы выделения продукта эффективны и экономичны благодаря непрерывности [278].

Метод непрерывного культивирования успешно применяют для исследований адаптации микробов к различным физическим и химическим веществам, так как в этих условиях адаптация проходит в 3—4 раза быстрее, чем в условиях стационарной культуры [183]. Этот метод чрезвычайно ускоряет работы по селекции активных рас.

Наличие микробного материала с постоянными свойствами расширяет и углубляет изучение физиологии и биохимии микробной клетки [178], а это в свою очередь позволяет эффективнее использовать деятельность микробов при промышленном производстве белков, аминокислот, витаминов, антибиотиков, ферментов и пр.

Непрерывное культивирование микроорганизмов применяют в первичном и вторичном виноделии, в спиртовой, ацетоно-бутиловой промышленности, в производстве кормовых дрожжей и уксусной кислоты. Разработано и осваивается непрерывное культивирование на промышленном образце в пивоваренной промышленности. Исследуются возможности применения этого метода в производстве хлебопекарских дрожжей, лимонной и молочной кислот [487, 488]. Производство антибиотиков методом непрерывного культивирования продуцентов еще не внедрено в промышленное производство. Исследования в этом направлении не выходят за рамки крупномасштабных лабораторных экспериментов [84].

Выбор метода и направленность ферментационного процесса определяются поставленной целью. Для получения большого количества биомассы обычно применяют простейший метод непрерывного культивирования — одноступенчатую систему: организм выращивают на одном субстрате, обеспечивающем максимальный выход биомассы или продукта, связанного с ростом организма (производство кормовых и пекарских дрожжей, вакцин и т. д.) [278]. Если одна стадия недостаточна для полного метаболического превращения при оптимальной скорости потока, когда желаемый продукт образуется в результате двух или более метаболических превращений, используется многоступенчатая система непрерывного культивирования микроорганизмов. Сначала продуцент выращивают в первом культиваторе непрерывно при равномерном перемешивании, затем активные клетки протекают через следующий сосуд, в который добавлен необходимый источник энергии, где завершается накопление ожидаемого продукта. Многоступенчатые системы используют для получения антибиотиков, исследования метаболизма и физиологического состояния культуры [278].

Схематически процесс непрерывного культивирования можно представить так: питательная среда течет непрерывно и однородно с заданной скоростью в культиватор, где быстро перемешивается с микроорганизмами. Благодаря подвижному равновесию между размножением и удалением клеток численность микроорганизмов, скорость их роста стабильны; скорость оттока среды с выращенными микроорганизмами

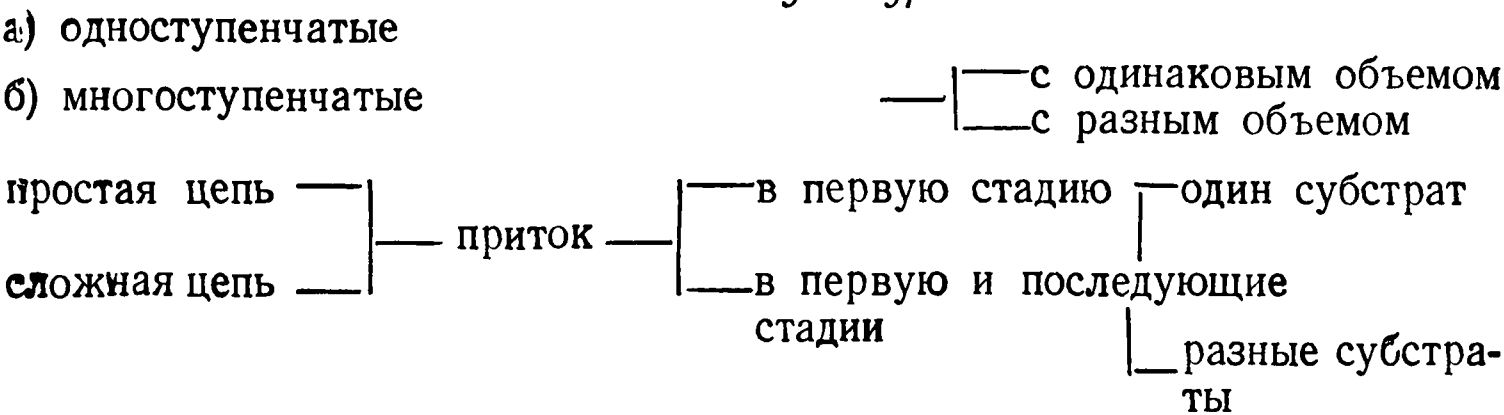
равна скорости притока питательной среды. Таким образом, микроорганизмы непрерывно размножаются со скоростью, соответствующей притоку питательных веществ при определенном режиме культивирования.

Классификация непрерывных систем культивирования и их основные характеристики представлены на схеме.

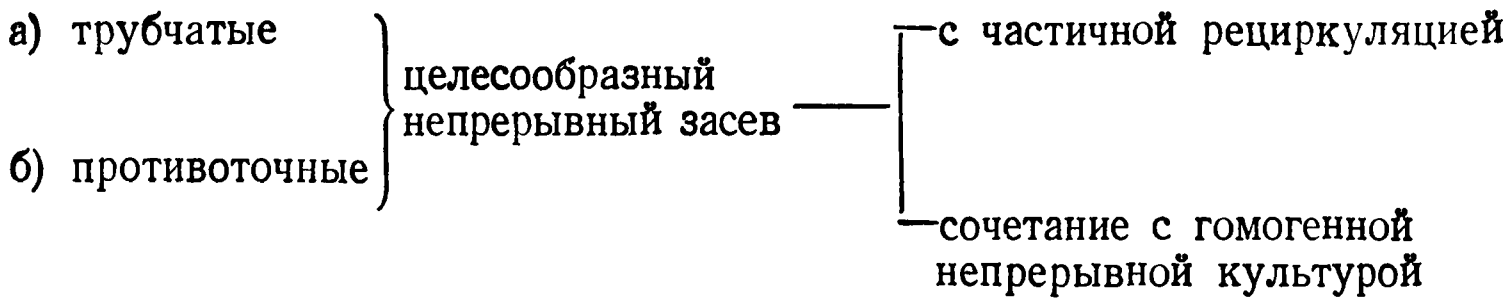
Схема классификации непрерывных систем культивирования [278]

Открытые непрерывные системы

Пространственно-гомогенные системы с постоянным составом культуры



Пространственно-гетерогенные системы с меняющимся составом культуры



жидкость — жидкость
жидкость — газ

Замкнутые непрерывные системы

- а) 100%-ная рециркуляция клеток в открытых системах (гомогенных и гетерогенных)
б) механическое отделение растущих клеток от питательной среды
в) клетки, растущие в интерфазе
- жидкость — газ (на поверхности без перемешивания).
жидкость — твердая фаза (пористая масса, почва, агар, сетка, стружка и т. п.)

Полунепрерывные системы

III.4.3.1. ГОМОГЕННЫЕ ОТКРЫТЫЕ СИСТЕМЫ

Одноступенчатые системы. Для одноступенчатого культивирования используют культиватор (рис. 62), в котором среда тщательно перемешивается. Определенный объем свежей питательной среды поступает в культиватор с постоянной скоростью; среда с микроорганизмами выте-

кает из культиватора с той же скоростью. Концентрация всех компонентов среды (клеток, субстратов и продуктов) одинакова во всем объеме, а следовательно, и в вытекающей жидкости. Скорость разбавления (D) должна поддерживать концентрацию лимитирующего субстрата на уровне, равном удельной скорости роста (μ). Скорость разбавления определяется объемом среды, протекающей за 1 ч через культиватор. Обратная ей величина — среднее время оборота ($1/D$), т. е. среднее время, в течение которого определенный компонент системы (например, клетка) остается в культиваторе. Следует также учитывать среднее время удвоения, средний возраст отдельной клетки и среднее физиологическое состояние, т. е. меру способности микроорганизма подвергаться соответствующим метаболическим превращениям. Среднее время удвоения ($g = \ln(2/\mu)$) представляет промежуток времени, требующийся для удвоения массы или численности клеток.

Доказана возможность культивирования при установившемся режиме в широком диапазоне скоростей разбавления и с концентрацией субстрата, практически равной нулю. Этот промежуток определяется двумя предельными скоростями разбавления. Первая — критическая скорость разбавления (D_c), которая больше, чем максимальная удельная скорость роста ($\mu_{\max}$). Микроорганизмы вымываются быстрее, чем растут, их концентрация постепенно снижается до нуля, тогда как концентрация субстрата (лимитирующий фактор) увеличивается до максимальных значений. Вторая — предельная скорость разбавления — очень низкая. Когда скорость потока становится меньше этой величины, клетки переходят в состояние лаг-фазы и прекращают размножаться.

При длительном непрерывном культивировании выход требуемого продукта иногда постепенно снижается; это явление принято называть вырождением культуры. Изменяя состав пита-

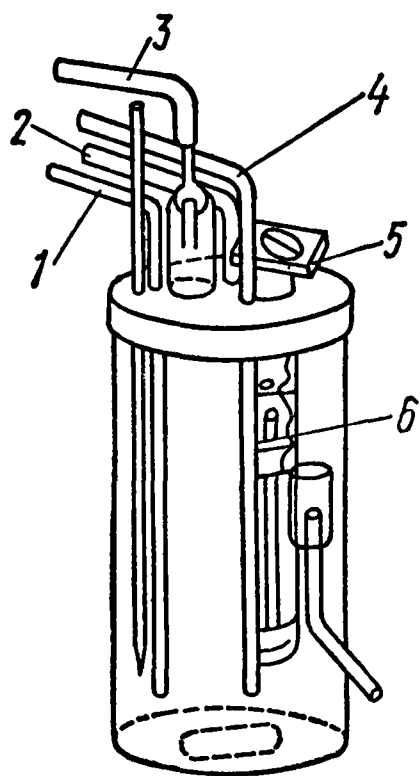


Рис. 63. Хемостат (микроферментер) [633]:

1 — трубка для отбора проб; 2 — трубка для вывода газовой смеси; 3 — трубка для ввода среды; 4 — трубка для ввода воздуха; 5 — термометр; 6 — микронагреватель.

тельной среды, температуру, тип перемешивания и аэрацию, можно предотвратить снижение выхода продукта.

Постоянные химические условия являются решающим фактором в гомогенных непрерывных проточных культурах, поэтому такой вид выращивания иногда называют хемостатным культивированием, а прибор для культивирования — хемостатом (рис. 63). Другой прибор для непрерывного культивирования — турбидостат. В хемостате задается определенная скорость разбавления, а концентрация микроорганизмов устанавливается произвольно в соответствии с их свой-

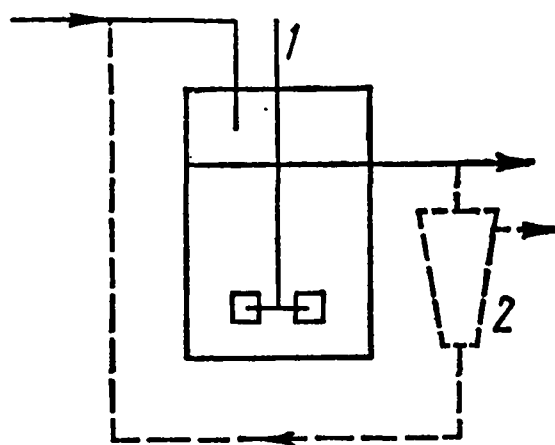


Рис. 62. Гомогенная непрерывная одноступенчатая система [382]:

1 — обычная; 2 — в некоторых случаях с возвратом сепарированных клеток.

ствами в данных условиях. В турбидостате с помощью регулирующего устройства, которое автоматически выбирает соответствующую скорость разбавления, задается постоянная концентрация клеток.

В современной физиологии микроорганизмов основной метод культивирования — хеостатный. Он позволяет изучать индивидуальное влияние разных факторов на развитие культуры, ее кинетические, биохимические и морфологические свойства и т. п. [26, 376, 633].

Культивирование микроорганизмов в турбидостате открывает возможности для разработки проблемы их быстрого и сверхбыстрого роста [107], изучения действия ингибиторов, отравляющих клетки и замедляющих их рост. Этот прибор используют в случаях, когда нужно выяснить влияние того или иного фактора на максимально возможную скорость роста [376].

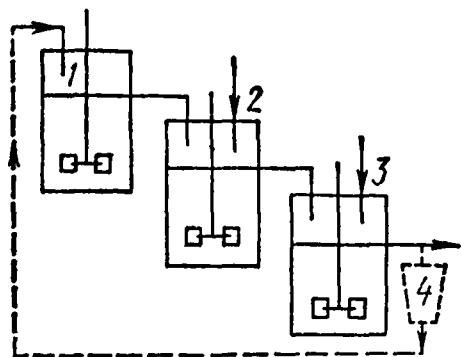


Рис. 64. Схема многоступенчатой гомогенной системы:

1 — простой; 2, 3 — сложной с составным притоком; 4 — с частичной рециркуляцией сепарированных клеток

Многоступенчатые системы. Многоступенчатое хеостатическое культивирование представляет собой ряд последовательных операций. При этом культиваторы соединены в параллельный ряд или каскад (рис. 64). Если по условиям культивирования требуются разные скорости потока или время оборота, применяют батарею культиваторов разного объема. Многоступенчатость в некоторых случаях достигается вертикальным или горизонтальным разделением сосуда на несколько камер или этажей.

Наиболее широко распространен тип многоступенчатого культиватора из одного ряда ферментеров с перемешивающим устройством, когда среда последовательно и непрерывно протекает через все ступени. В комплексных батареях с многократной подачей субстрата (см. рис. 64, 2, 3) свежая питательная среда подается как в первую ступень, так и в последующие в зависимости от технологии процесса, причем состав среды может быть различным.

Одно-, многоступенчатые системы с частичной рециркуляцией (см. рис. 64, 4). В этих системах взвесь клеток, выходящая из определенной ступени, концентрируется в непрерывнопроточной центрифуге или в осадочном сосуде и часть взвеси рециркулирует в одну из предшествующих ступеней. Оставшийся субстрат вместе с клетками вытекает для дальнейшей обработки. Условия в системе определяются соотношением между концентрацией клеток в культиваторе, в который рециркулирует взвесь, и концентрацией клеток в оборачивающейся взвеси (отношение должно быть больше единицы), а также объемным отношением рециркуляции, т. е. отношением объема рециркуляционного потока к объему протекающей среды. Таким образом, концентрация клеток в соответствующей ступени выше, чем концентрация конечной вытекающей среды.

III.4.3.2. ГЕТЕРОГЕННЫЕ ОТКРЫТЫЕ СИСТЕМЫ

Отличие этих систем от предыдущих заключается в том, что культура не перемешивается или перемешивается весьма слабо. Питательная среда протекает непрерывно как однородная струя через постоянный объем культиватора. Градиент изменения состава среды в сосуде вдоль потока зависит от скорости потока. Система является пространственным вариантом периодической культуры.

Трубчатые системы. В этих системах однородная пульсирующая струя среды подается из хемостата в трубчатый реактор (рис. 65). Среда не перемешивается и не аэрируется, организмы растут во взвешенном состоянии в анаэробных условиях. Трубчатый реактор может быть прямым, S-образным, спиральным, его устанавливают горизонтально или вертикально.

При работе трубчатой системы в установленном режиме необходим постоянный засев культурой, которую готовят отдельно в хемостате, смешивают с новой питательной средой и непрерывно вводят в трубчатый реактор, или же относительно постоянное количество клеток рециркулирует в свежую питательную струю после прохождения через культиватор (см. рис. 67). Общая скорость разбавления в этой системе определяется отношением притока среды к общему объему, среднее время оборота является обратной величиной. При рециркуляции клеток и среды отношение концентрации компонентов (клеток, субстрата, продукта) в притоке и оттоке определяется объемным соотношением, а также начальной концентрацией субстрата в свежей среде. Постоянный режим устанавливают при общей скорости разбавления, допускающей повышение концентрации клеток в течение оборота, достаточное для предотвращения их вымывания.

Противоточные системы. В противоточных системах две несмешивающиеся фазы протекают в противоположных направлениях (рис. 66). Такие системы совмещают некоторые особенности культиваторов трубчатого и перемешивающего типов. Пространство культиватора обычно разделено на ярусы, размещенные различным образом. Питательная среда (водная фаза) с активной взвесью клеток протекает или просачивается через вертикальный культиватор. Более легкая жидкая или газовая фаза течет в противоположном направлении, не смешиваясь с более тяжелой водной фазой. Как и в трубчатой системе, в этом случае наиболее эффективно непрерывное введение нового засева [4]. Иногда часть клеток, прошедших через реактор, удаляется и может быть использована для рециркуляции [3].

III.4.3.3. ЗАМКНУТЫЕ СИСТЕМЫ

Замкнутые непрерывные системы отличаются от открытых тем, что все или часть микроорганизмов остаются в системе; количество отмерших клеток постепенно увеличивается, режим культивирования никогда не достигает динамического равновесия. Замкнутые системы

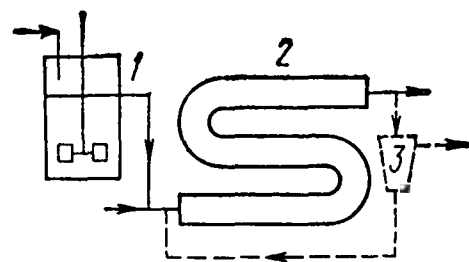


Рис. 65. Схема гетерогенного непрерывного трубчатого культиватора:

1 — хемостат; 2 — трубчатый реактор; 3 — частичный возврат клеток в свежую питательную среду.

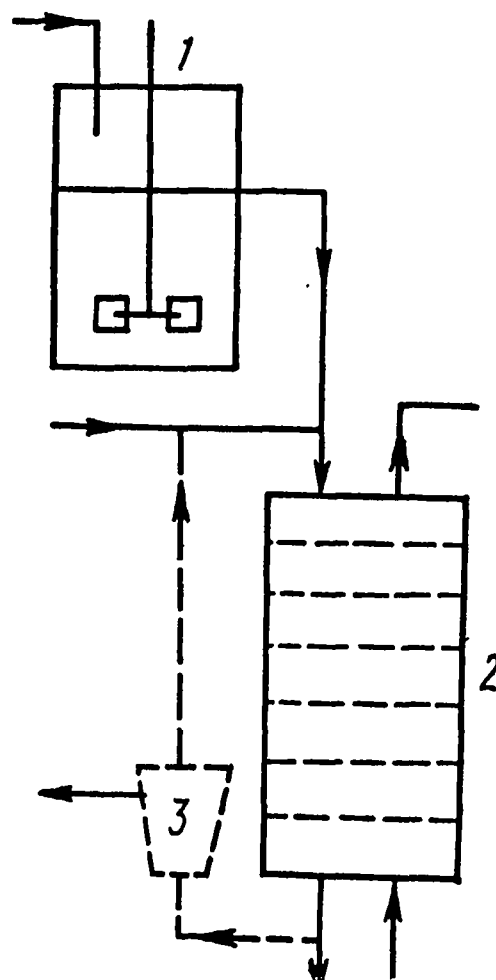


Рис. 66. Схема противоточного культиватора:

1 — хемостат; 2 — противоточный культиватор; 3 — частичная рециркуляция сепарированных клеток.

культивирования нельзя рассматривать как полноценные непрерывнопроточные системы, способные функционировать неограниченное время.

III.4.3.4. ПОЛУНЕПРЕРЫВНЫЕ СИСТЕМЫ

Полунепрерывные системы основаны на принципе повторного и последовательного периодического культивирования в одном или нескольких сосудах, соединенных последовательно. Различают откры-

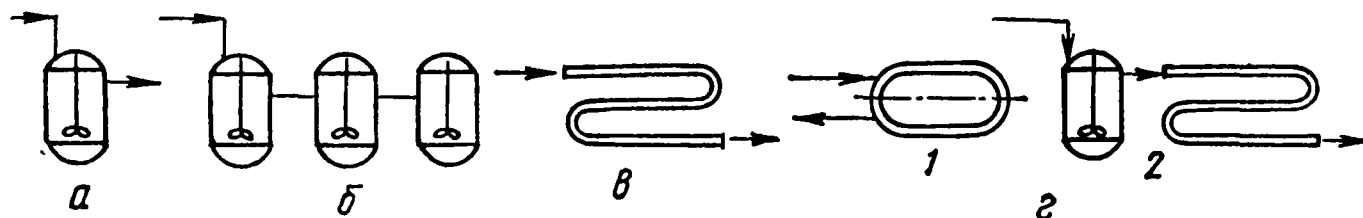


Рис. 67. Культиваторы для непрерывных ферментаций в прямоточных стерильных и нестерильных слабокислых системах [488]:

a — одноступенчатые с искусственным перемешиванием или без перемешивания; *б* — многоступенчатые с искусственным перемешиванием или без перемешивания; *в* — трубчатые с искусственным перемешиванием или без перемешивания; *г* — смешанные горизонтальные (1) и вертикально-трубчатые (2).



Рис. 68. Культиваторы для непрерывных ферментаций в рециркуляционных стерильных и кислых системах:

a — одноступенчатые с перемешиванием; *б* — секционные и многоступенчатые с перемешиванием; *в* — трубчатые; *г* — смешанные с мембранами для разделения фаз (1) и башенные заполненные (2).

тые и замкнутые системы такого типа, однако высказываются рекомендации о целесообразности их разделения на прямоточные и рециркуляционные (рис. 67, 68).

III.4.3.5. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ

Наиболее глубоко изучено непрерывное культивирование *Penicillium chrysogenum* с целью получения пенициллина [273, 546, 736, 738, 755]. Исследуются возможности использования метода непрерывного культивирования грибов для получения ряда ферментов: протеазы и глюкоамилазы (*Asp. niger*), пектолитических ферментов (*Asp. foetidus*) и др. [268].

Получение протеазы (рис. 69). *Asp. niger* культивируют в чашке Петри диаметром 25 см, снабженной отверстиями для ввода среды и вывода культуральной жидкости. В течение одного дня гриб выращивают на первой среде, содержащей серу, глюкозу, аминокислоты, минеральные соли и сернокислый натрий, затем на второй, не содер-

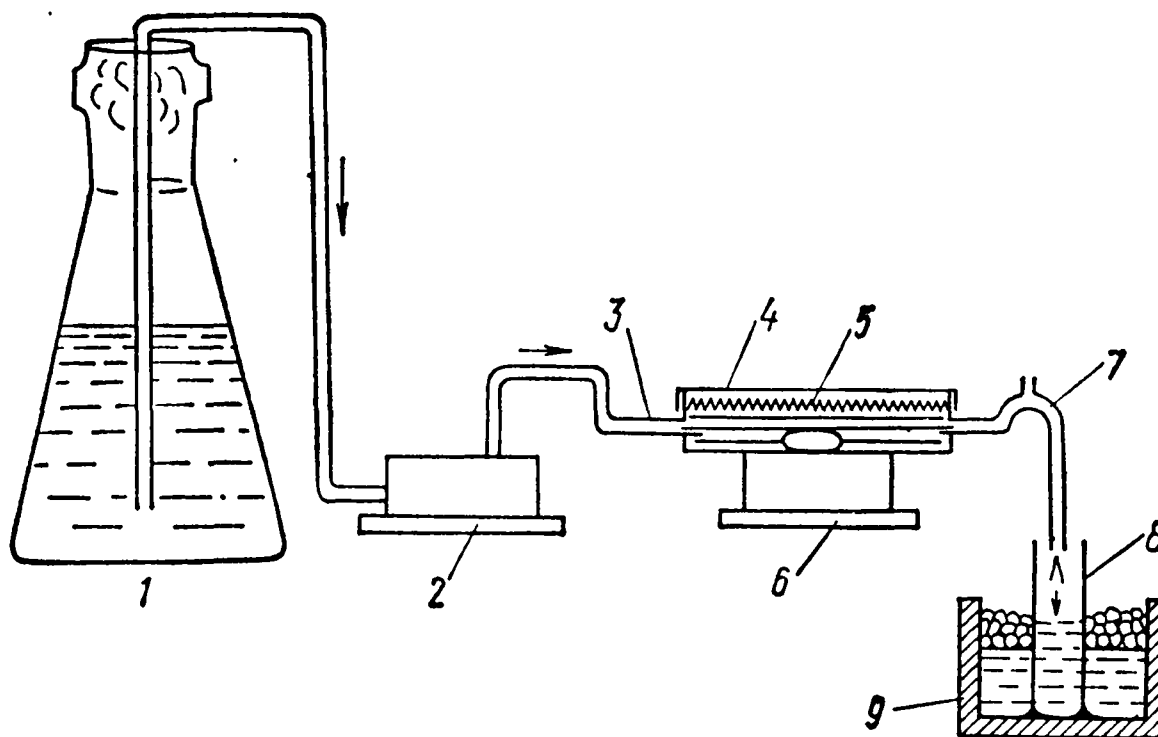


Рис. 69. Схема аппарата для получения протеазы методом непрерывного культивирования:

1 — сосуд с S-дефицитной средой; 2 — насос; 3 — вводная трубка; 4 — сосуд для культивирования; 5 — мицелий; 6 — мешалка; 7 — переливающее устройство; 8 — градуированный цилиндр; 9 — сосуд с охлаждением.

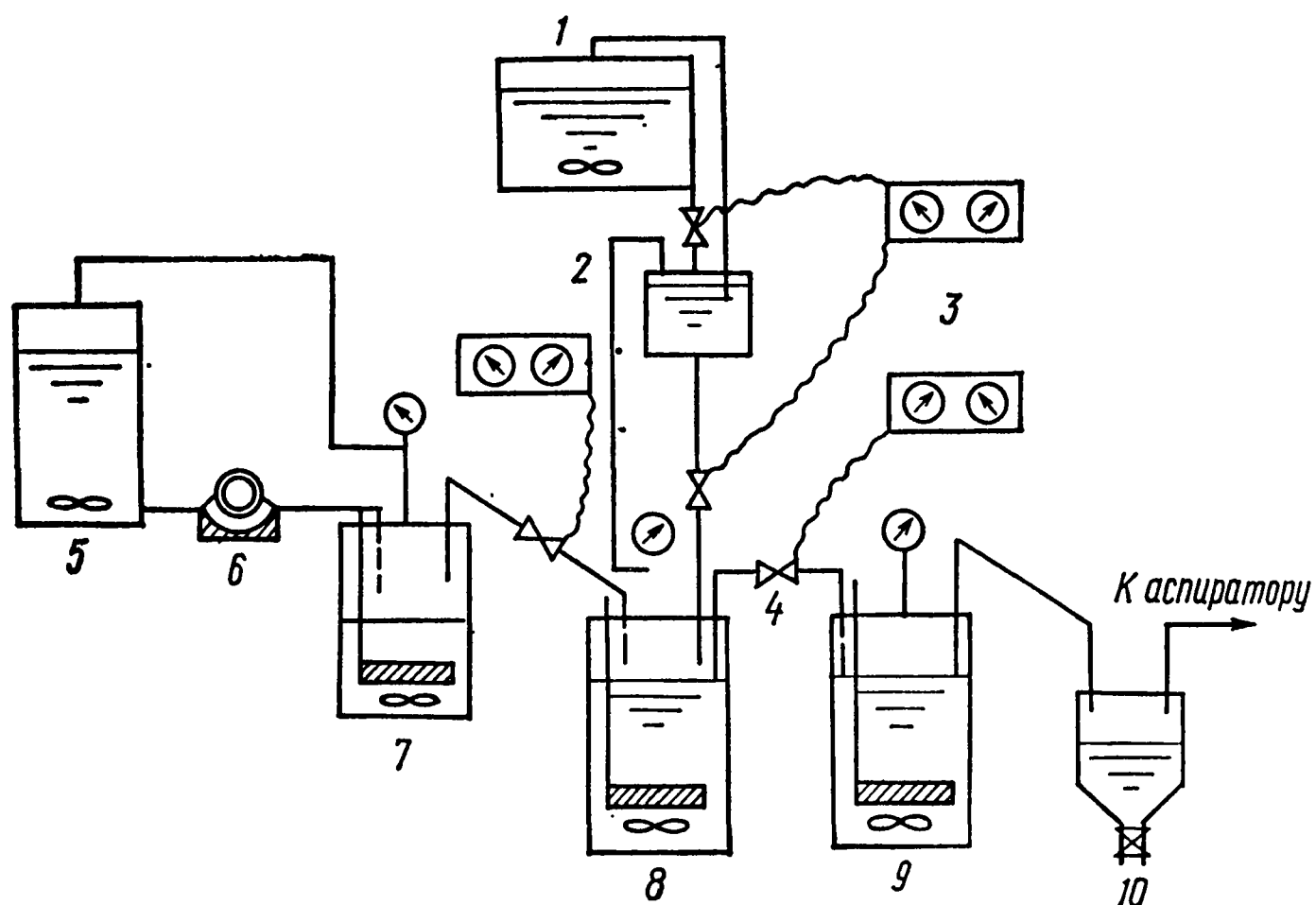


Рис. 70. Схема аппарата для получения глюкоамилазы методом непрерывного культивирования:

1 — блок питания; 2 — контрольный уровень; 3 — двойные часы; 4 — электромагнитный клапан; 5 — запасник; 6 — измерительный насос; 7—9 — сосуды для культивирования; 10 — приемник.

жащей сернокислого натрия. Слой среды в чашке — 2 см; перемешивание среды под пленкой гриба осуществляют с помощью магнитной мешалки. При достижении рН среды значений 4—4,5 наблюдается активное образование протеазы, которое продолжается в течение 10 дней и более [804].

Получение глюкоамилазы (рис. 70). *Asp. niger* (аденинзависимый штамм) проходит трехстадийное культивирование. Скорость роста культуры ограничена концентрацией аденина. На первой стадии при интенсивном росте клеток гриба образуется незначительное количество глюкоамилазы. В начале второй стадии скорость образования фермента близка к максимуму, наблюдаемому в стационарных условиях культивирования, и при непрерывном культивировании увеличивается. Скорость разбавления ростовой среды при достижении клетками

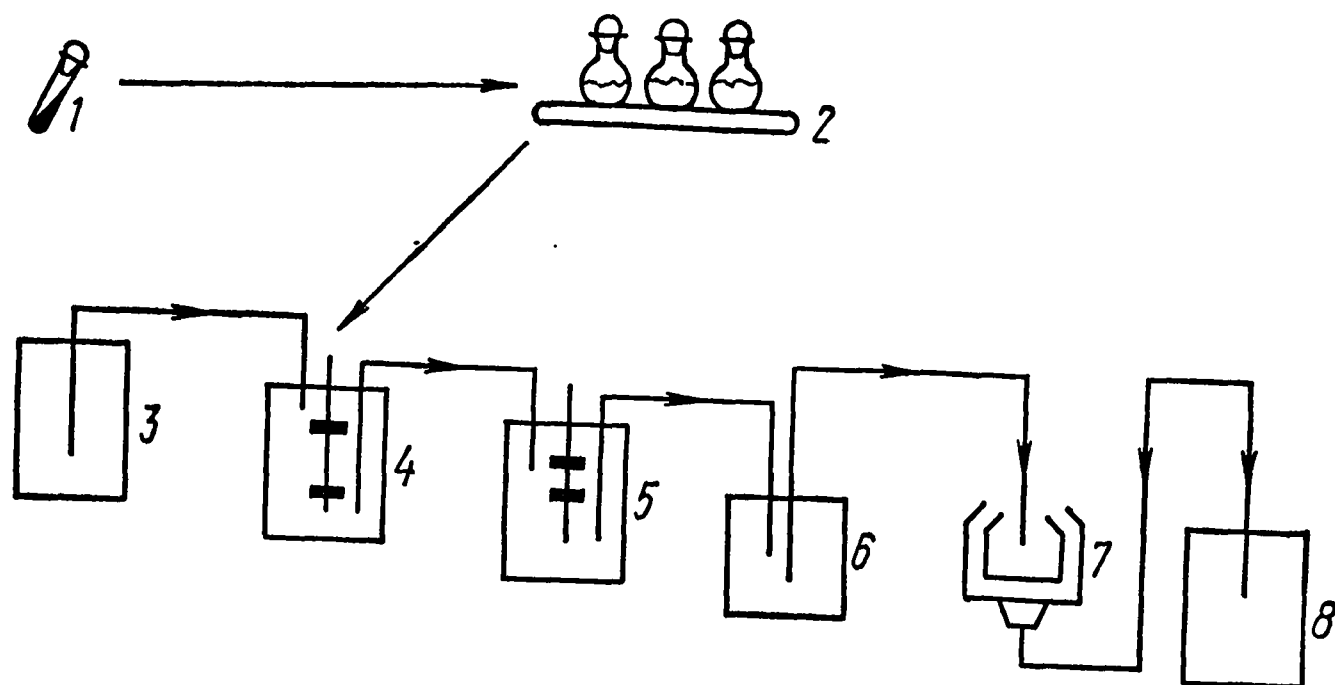


Рис. 71. Схема аппарата для получения пектиназы методом непрерывного культивирования *Aspergillus foetidus*:

1 — пробирка с суловым агаром для получения спор; 2 — колбы с суспензией спор, помещенные на качалку, для получения инокуляма; 3 — сосуд с питательной средой; 4 — ферментер первой ступени; 5 — ферментер второй ступени; 6 — приемный сосуд; 7 — центрифуга; 8 — сосуд для отцентрифугированной жидкости.

20-часового возраста составляет $0,1 \text{ ч}^{-1}$. Третья стадия начинается, когда возраст культуры в периодических условиях достигает 92 ч. Скорость разбавления такая же, как во второй стадии.

Получение пектолитических ферментов (рис. 71). Культивирование *Asp. foetidus* данным методом предполагает: 1) получение спорового материала в пробирках на суловом агаре; 2) засев спорами, суспендированными в 0,1%-ном водном растворе Твина-80, в колбы емкостью 500 мл, содержащие 100 мл среды, для получения вегетативного посевного материала; выращивание на качалках 48 ч; 3) непрерывное культивирование двухступенчатым методом в ферментерах («Biotec») емкостью 12 л каждый, затем после внесения в среду 8—10% посевного материала — на среде Чапека — Докса с 2% пектина вместо сахарозы. Среда аэрируется воздухом, поступающим со скоростью 1 объем воздуха на 1 объем среды в минуту при перемешивании со скоростью 500 об/мин. Температура выращивания 30°C . В конце экспоненциальной фазы роста гриба (примерно после 36 ч периодического культивирования) в первый ферментер начинают непрерывно добавлять питательную среду. Коэффициент разбавления $0,24\text{—}0,51 \text{ ч}^{-1}$. Скорость протекания питательной среды регулируют таким образом, чтобы содержание мицелия в ферментере первой ступени удерживалось на уровне, достигаемом после примерно 36-часового периодического культивирования. В ферментере второй ступени популяция сохраняется главным образом в фазе стационарного роста. Биосинтез ферментов

во втором ферментере в 5 раз интенсивнее, чем в первом. Продолжительность культивирования 240 ч.

При непрерывном культивировании использование емкости ферментера можно увеличивать примерно на 50%, но пектолитическая активность при этом снижается на 20% по сравнению с периодическим культивированием.

Анализ результатов, полученных при непрерывном культивировании позволяет сделать вывод, что максимальный выход тех или иных ферментов наблюдается, когда их накопление происходит одновременно с ростом культуры [268]. На опытной установке для непрерывного культивирования микроорганизмов, включающей 6 ферментеров, при сохранении стерильности среды, воздуха, применяемого для аэрации, и оборудования получены результаты, которые показали, что биосинтез и локализация *Asp. niger* (штамм NRRV 377), *Asp. batatae* (штамм 61) и *Asp. usatii* (штамм 3758/45) при проточном культивировании подчиняются закономерностям, установленным для периодических культур; процесс биосинтеза при этом значительно интенсифицируется (скорость созревания культур сокращается на 20—30%). На основании этих исследований разработаны технологическая схема и регламент для проточного выращивания микроскопических грибов [80].

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТА И БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБОВ

IV.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Рост грибов — это процесс, заключающийся в приросте биомассы, т. е. в увеличении размеров или количества клеток в результате сложных, последовательно протекающих изменений общего и видоспецифического обмена веществ. Особенность метаболических процессов обусловлена сочетанием генетических свойств гриба и условий его культивирования. Существенное влияние на рост гриба и направленность метаболизма оказывают способы культивирования, обеспечивающие различное снабжение растущей культуры кислородом, неодинаковую скорость диффузии питательной среды, оттока ингибирующих продуктов метаболизма и т. п. Для грибов характерны гетерогенный генетический аппарат, способность к половому и бесполому размножению, в значительной степени обуславливающие их морфологическую дифференциацию и метаболическую активность [543, 674]. У дейтеромицетов, которые наиболее часто используются как объекты теоретических исследований в области генетики, физиологии, биохимии, молекулярной биологии и как продуценты различных физиологически активных веществ в промышленности, распространены анастомозы, гетерокариозис, парасексуальный процесс, определяющие значительную амплитуду их генетической и цитоплазматической изменчивости. Оптимальный рост гриба и биосинтез определенного метаболита обычно достигаются при учете генетических особенностей продуцента и условий культивирования.

Условно процесс метаболизма у грибов можно разделить на первичный, характеризующийся индукцией ферментов, превращающих источники питания и энергии в существенно необходимые компоненты клетки — ДНК, РНК, аминокислоты, белок и другие, и вторичный, характеризующийся преобладанием биосинтеза сложных, обычно видоспецифических метаболитов (продуктов вторичного метаболизма) из метаболитов первичного метаболизма и значительно сниженной активностью или отсутствием процессов первичного метаболизма [517, 524, 529, 737].

Гифальное строение большинства грибов, апикальный рост, разная скорость образования клеточных структур в апикальной и преапикальной зонах и зоне старения гифы, ценоцитический тип септирования свидетельствуют о качественной неоднородности, различной метаболической активности, морфогенетической дифференциации и репродукции клеток гиф. Растущий конец гифы (апекс) более богат цитоплазмой, лишен ядер или они немногочисленны у грибов с несептиро-

ванным мицелием, содержит много митохондрий, характеризуется повышенным содержанием РНК, белка, отдельных ферментов. Клетки предапикальной зоны содержат большое количество вакуолей, в которых сосредоточены резервные субстраты и ферменты, участвующие в их превращениях. Каждая клетка гифы способна к прорастанию и образованию новой гифы и систем гиф, т. е. мицелия.

Возрастная разнокачественность клеток гиф наиболее четко проявляется при поверхностном культивировании колонии на агаризованных питательных средах, в меньшей степени — при периодическом погруженном культивировании; наиболее однотипны клетки гиф, выращенные в непрерывной культуре. Несмотря на то что мицелиальные грибы были первыми организмами, выращенными методом погруженного культивирования, качественные и количественные критерии оценки ростовых процессов и связанной с ними биосинтетической активности разработаны для них в значительно меньшей мере, чем для бактерий и дрожжей [51, 280, 347].

IV.2. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РОСТА ГИФАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Спора — орган полового и бесполого размножения грибов. Хламидоспоры, геммы, клетки хламидоспорового типа, склероции (до прорастания) относятся к покоящимся формам жизненного цикла грибов. В этих структурах почти отсутствуют ростовые процессы, и им свойственна очень низкая метаболическая активность. При прорастании спор (конидий, спорангиоспор, сумкоспор, базидиоспор) определяют:

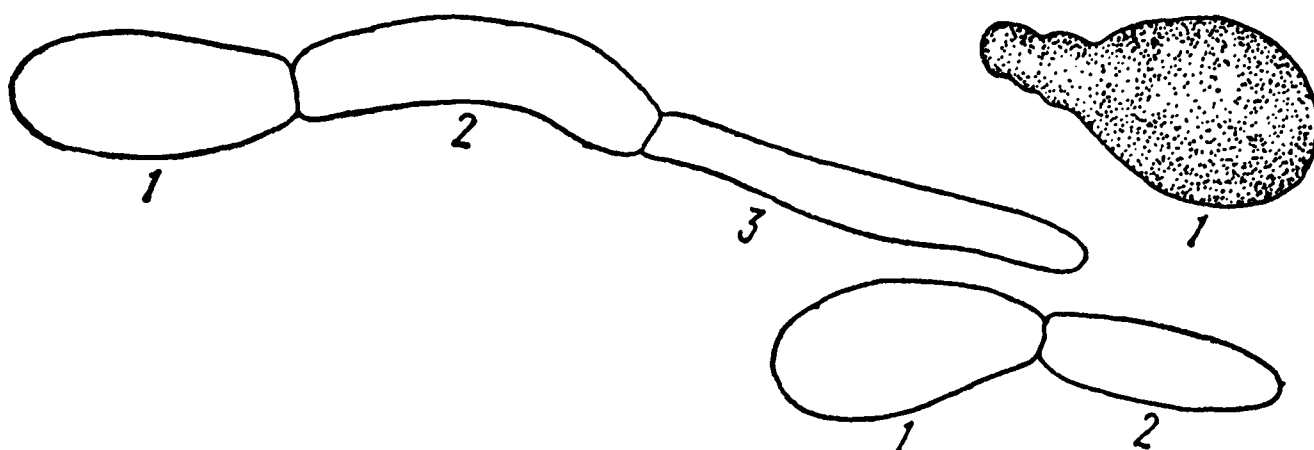


Рис. 72. Прорастание микроконидии *Fusarium moniliforme* (1); образование ростковой трубки (2); начало роста гифы (3).

1) степень увеличения их объема; 2) интенсивность прорастания, т. е. время появления первой ростковой трубки и числа ростковых трубок (в процентах; на основании изучения не менее чем 100 спор); 3) размеры ростковой трубки, т. е. длину ее до первой перегородки (рис. 72).

При росте гиф определяют длину главной гифы, число и скорость образования перегородок до появления ветвления первого порядка [532], размеры гиф и число клеток ветвлений второго, третьего и т. д. порядков (рис. 73). Систему гиф — *мицелий* изучают при поверхностном культивировании гриба на агаризованных питательных средах (в виде колоний) [741] или при периодическом погруженном культивировании (в виде в разной степени агрегированных «шариков» или разрозненных гиф — «нитчатый» рост — в зависимости от густоты посева и других факторов).

Дифференциация клеток мицелия с возрастом и истощением отдельных источников питания и энергии заключается в изменении размеров клеток гиф и образования фрагментов «эвакуированного» мицелия, т. е. нежизнеспособных клеток, из которых содержимое через поры перегородок переместилось в другие клетки, и обычно интеркалярных хламидоспор и клеток хламидоспорового типа.

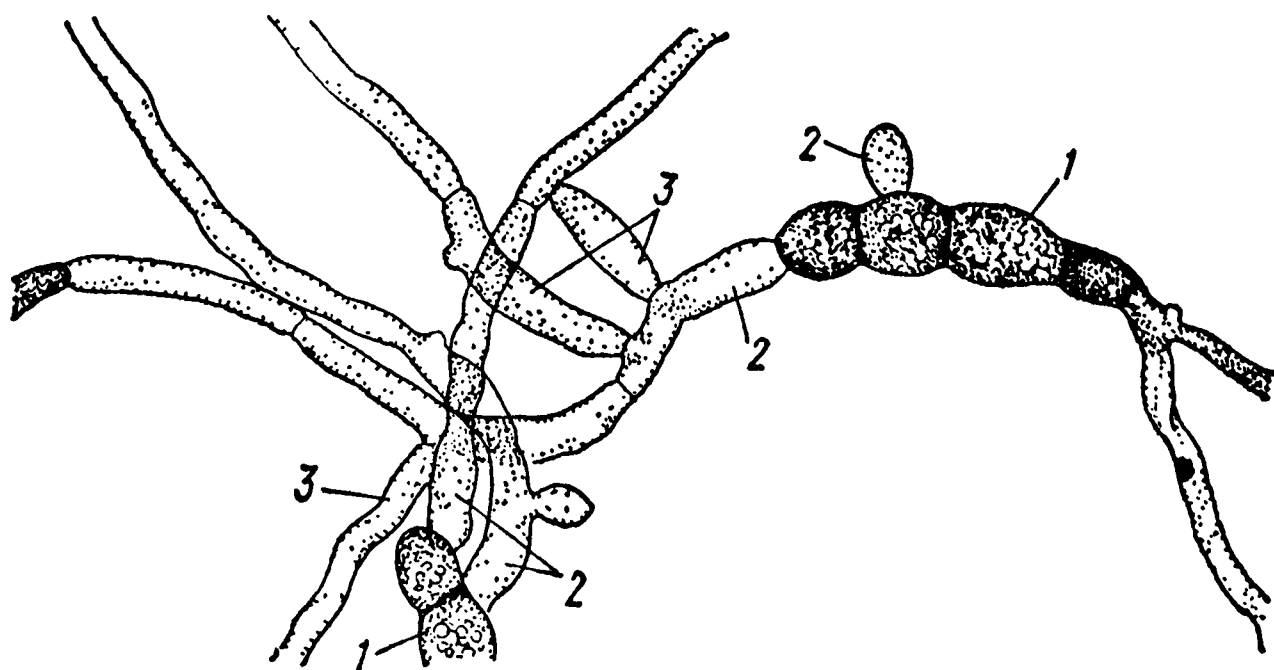


Рис. 73. Ветвление гиф при прорастании макроконидий *Fusarium solani*:

1 — набухшие и прорастающие клетки макроконидий главной гифы; 2 — ростковая трубка; 3 — ветвление первого порядка.

Репродуктивная фаза роста грибов представляет собой специфические процессы морфогенеза, связанные с генетическими признаками гриба и морфогенетическим влиянием продуктов метаболизма. При росте колонии образуются репродуктивные органы, специфичные для представителей каждого таксона. У одних видов грибов при погружен-

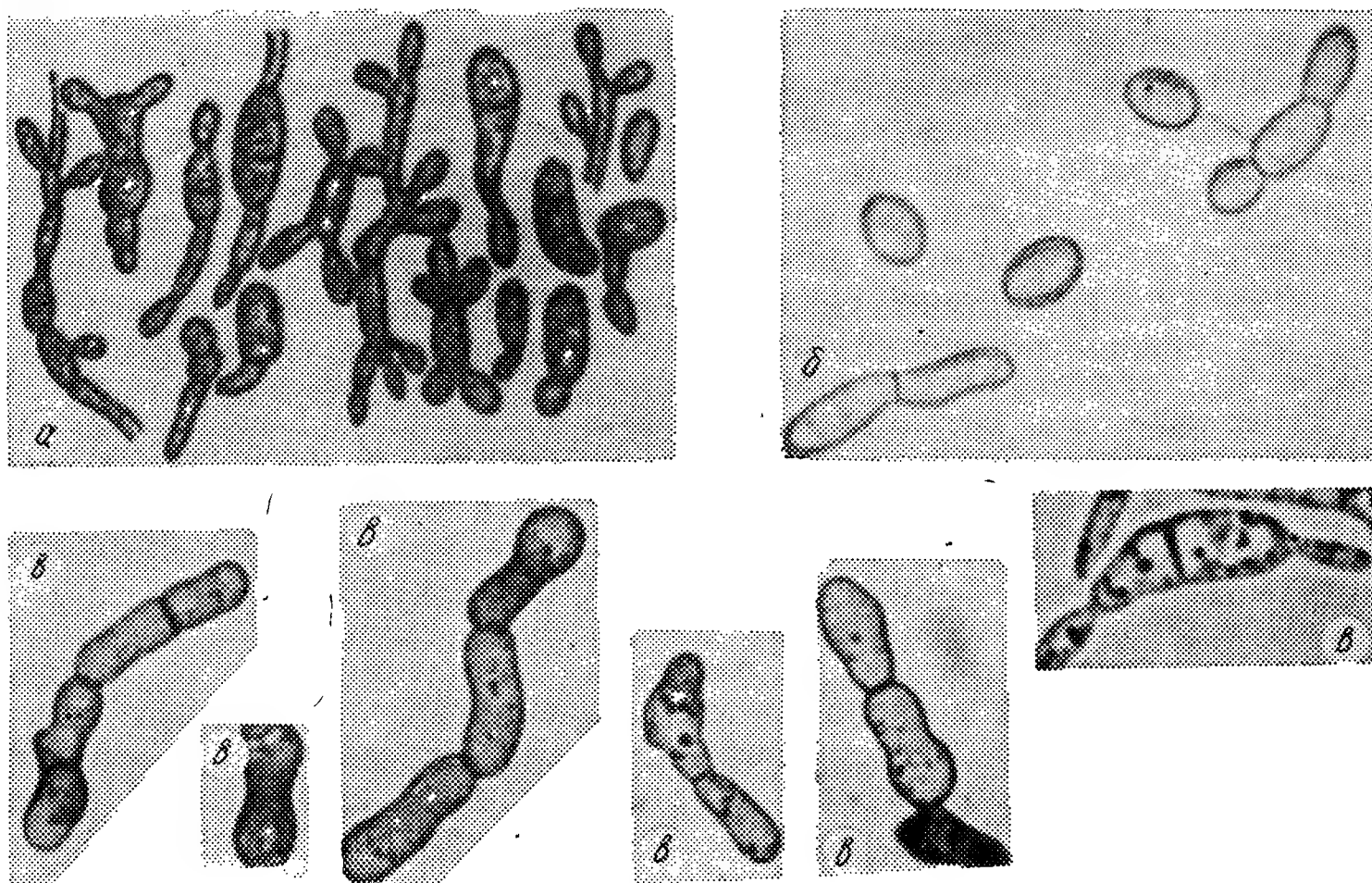


Рис. 74. Дрожжеподобные клетки *F. oxysporum* (a); *F. moniliforme* v. *lactis* (b); *F. moniliforme* v. *subglutinans* (c).

ном периодическом культивировании формируются репродуктивные структуры, аналогичные образуемым при поверхностном культивировании на агаризованных средах, у других — интенсивность репродуктивных процессов значительно снижена или отсутствует.

Цикл развития грибов при культивировании — от прорастания споры до образования репродуктивных органов — у разных видов не одинаков и зависит от многих факторов. При поверхностном культивировании колонии споры обычно прорастают не сразу; при погруженном периодическом — споры (особенно видов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* и др.) нередко сразу прорастают мицелием и дают одну или несколько репродуктивных генераций. При этом размеры, число спор и продолжительность цикла развития разных генераций различны. Соотношение мицелиального и спорового типов роста в культуре зависит от условий культивирования и свойств гриба.

Многим видам грибов свойствен диморфизм, т. е. способность роста в гифальной или дрожжеподобной форме. В зависимости от условий культивирования мицелиальные грибы могут образовывать дрожжеподобные клетки, а дрожжеподобные грибы — гифальные клетки. Кроме того, многие виды грибов при погруженном культивировании образуют клетки, подобные клеткам оболочек склероциев, т. е. проявляют более или менее выраженную морфологическую дифференциацию, которую необходимо учитывать при характеристике роста грибов (рис. 74).

IV.3. ФАЗЫ РОСТА ГРИБОВ

1. **Прорастание спор:** а) набухание — увеличение объема спор вследствие превращений эндогенных и экзогенных субстратов и начальных процессов метаболизма, т. е. синтеза НК, белков (обычно продолжительность фазы 4—8 ч в зависимости от свойств культуры гриба и условий культивирования); б) образование ростковой трубки до первой перегородки или ее рост до появления бокового ветвления у грибов с несептированным мицелием.

2. **Логарифмическая, или лаг-фаза** (адаптивная фаза). Начальный рост (ветвление) мицелия. Как и у одноклеточных организмов, в зависимости от условий культивирования продолжительность ее различна. Период замедленного роста связан с индукцией соответствующих ферментов, комплекс которых определяется источниками питания и энергии. Продолжительность лаг-фазы в значительной мере зависит от качества инокулюма, степени его предварительной адаптации к условиям среды, генетической однородности посевных спор, интенсивности их прорастания и других факторов.

3. **Ускоренный неравномерный рост.** Масса мицелия увеличивается неравномерно.

4. **Экспоненциальный (неуклонный и равномерный) рост.** Продолжается до истощения одного из лимитирующих рост субстратов или факторов среды или до образования метаболитов, ингибирующих рост. Характеризуется наиболее активными метаболическими процессами, связанными с синтезом веществ грибного организма.

5. **Старение.** Характеризуется спадом метаболических процессов, которые обусловлены ростом, истощением питательной среды, образованием и накоплением вторичных продуктов метаболизма в клетке и среде, спорообразованием, явлениями автолиза мицелия, выражающимися в снижении его массы, а также морфологической дифференциа-

цией, связанной с образованием клеток хламидоспорового типа, полых клеток, иногда с образованием протопластов, реже — с лизисом отдельных клеток. Продолжительность той или иной фазы роста зависит от видовых особенностей гриба, условий культивирования (среды, густоты инокулюма, степени аэрации и др.) (рис. 75).

Показателями роста грибов являются скорость, продолжительность лаг-фазы, урожай, или биомасса, мицелия к концу опыта. Про-

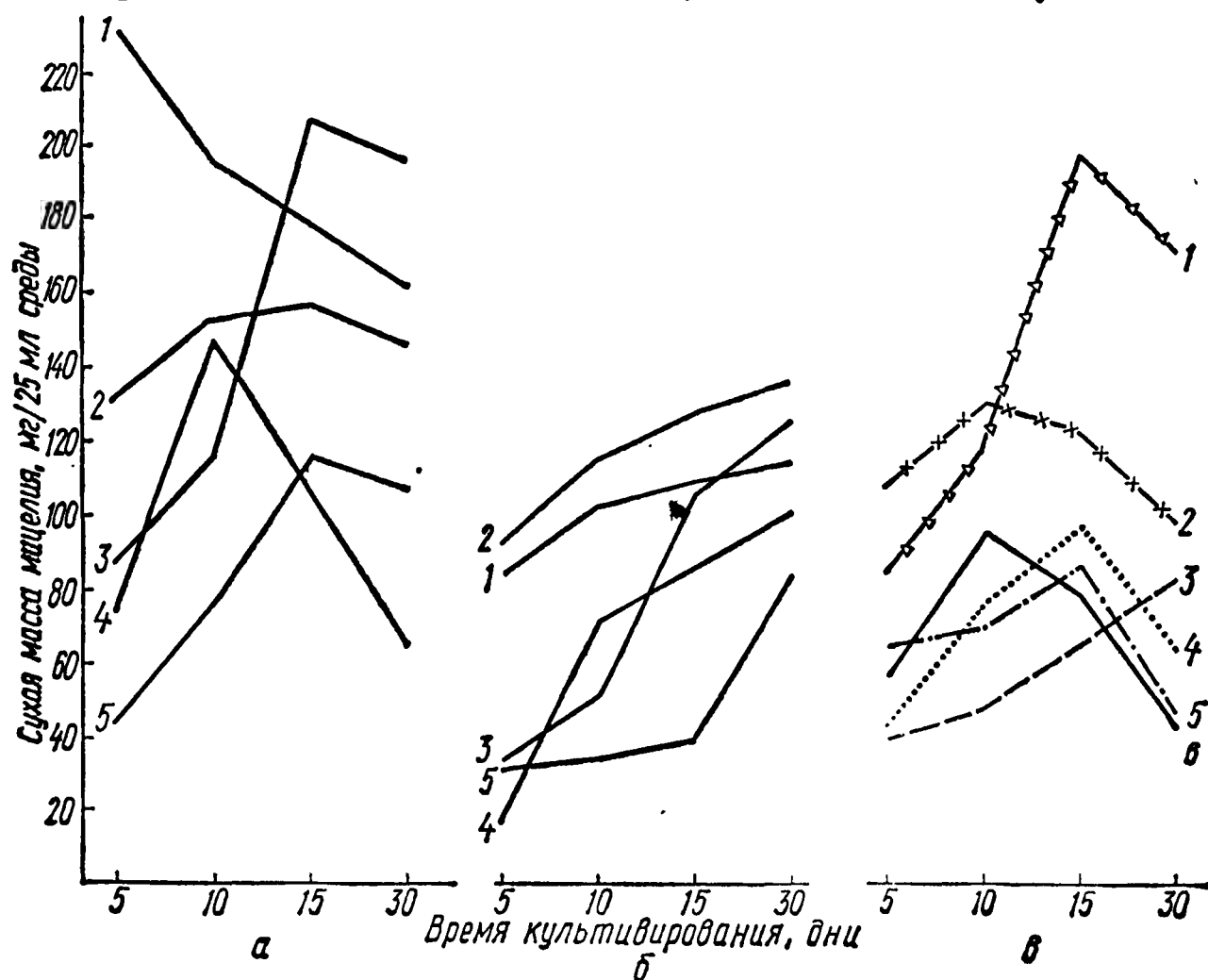


Рис. 75. Зависимость роста мицелия разных видов фузариум от источника углерода (а, б):

1 — *F. trichothecioides*; 2 — *F. solani*; 3 — *F. culmorum*; 4 — *F. oxysporum*; 5 — *F. avenaceum*.

Рост *F. culmorum* на средах с разным источником углерода (в):

1 — сорбит; 2 — мальтоза; 3 — ксилоза; 4 — лимонная кислота; 5 — крахмал; 6 — глюкоза.

должительность лаг-фазы может быть уменьшена или ее можно миновать при оптимальных условиях культивирования (соответствующих источниках питания, температуры, рН среды и пр.). Продолжительность экспоненциальной фазы может быть также уменьшена или увеличена в зависимости от цели опыта с помощью добавления питательных веществ, введения ингибиторов и стимуляторов, изменения температуры, рН среды, добавления окислителей или восстановителей и действия других факторов [51, 179, 181, 377, 509, 533, 535, 645, 687, 716, 735, 755, 808, 810, 812, 814].

IV.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТА ГРИБОВ

IV.4.1. ИЗМЕРЕНИЕ ЛИНЕЙНОГО РОСТА КОЛОНИЙ

Для определения линейного роста измеряют диаметр колоний (от места посева до конца зоны роста мицелия), растущих на плотной среде, обычно в чашках Петри с одинаковым слоем среды, через определенные

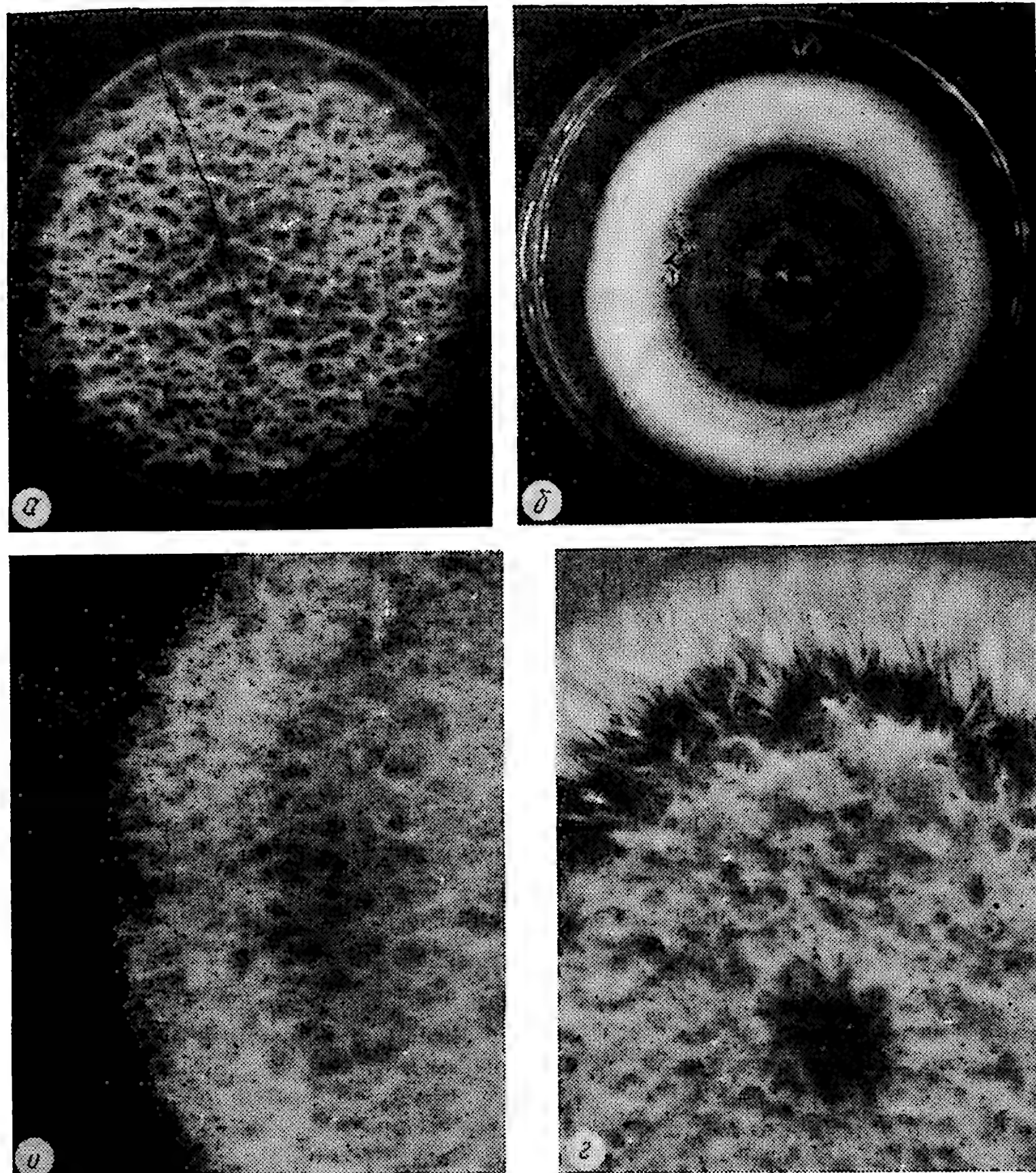


Рис. 76. Колонии *Fusarium oxysporum* (а), *Dendrodochium toxicum* (б), край колонии *F. oxysporum* (в) и *Stachybotrys alternans* (г) на плотной среде.

промежутки времени. В некоторых случаях измерение производят в специальных пробирках с застывшим горизонтальным слоем плотной среды равномерной толщины.

Изучаемый гриб высевают в центр поверхности плотной питательной среды по возможности немногочисленным инокулюмом всегда одной плотности, особенно при изучении влияния условий культивирования на рост колоний.

Диаметр колонии измеряют в двух взаимноперпендикулярных направлениях в двух-трех повторностях через определенные промежутки времени. Количество измерений зависит от скорости роста гриба, оно больше у быстрорастущих видов (муконовых, триходерм и некоторых других). Результаты измерений изображают графически

в равномерной или логарифмической шкале. Уровень распространения мицелия на плотной среде не всегда является показателем роста, т. е. увеличения биомассы гриба. Определение линейного роста, например, малопригодно для изучения использования грибом разных компонентов среды, так как значительное распространение мицелия по поверхности субстрата может иметь место на малопитательных средах. Некоторые виды грибов на поверхности плотной среды, лимитирующей рост, образуют широко распространенную, но тонкую, пленчатую колонию, а при росте на плотной оптимальной среде колония

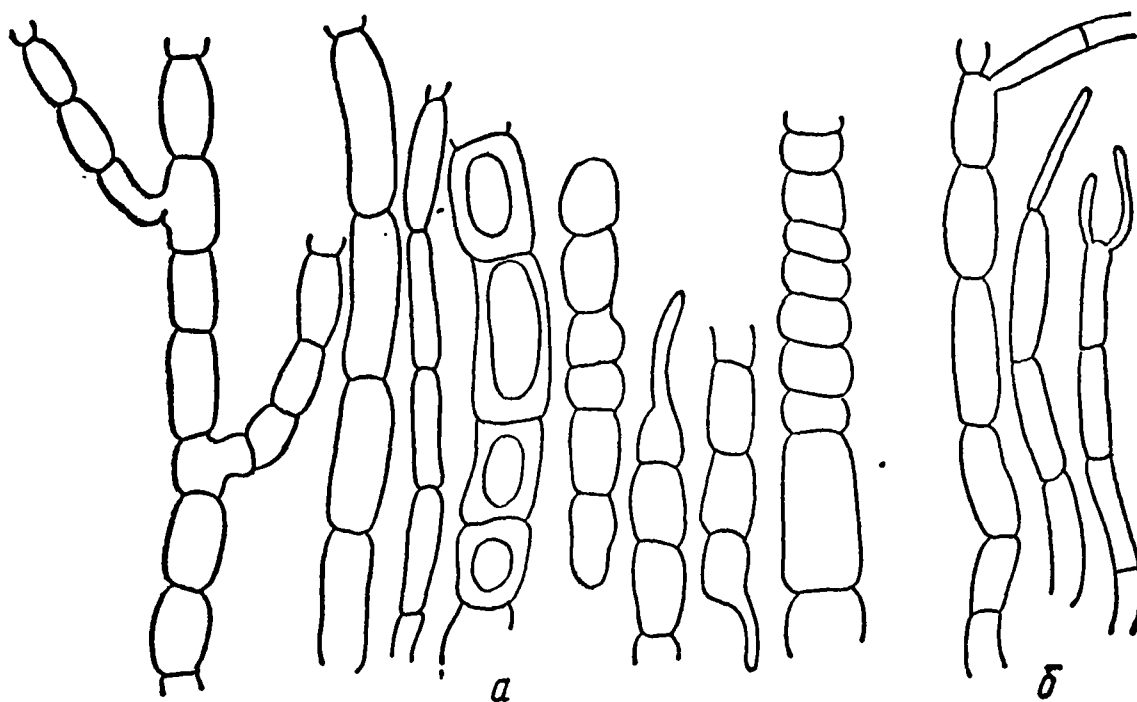


Рис. 77. Изменение морфологии и размеров клеток воздушного и субстратного мицелия *Fusarium culmorum* в зависимости от возраста культуры (а). 20-дневные гифы воздушного мицелия *F. oxysporum*, выращенного на агаризованном сусле (б).

гриба может достигать такого же диаметра, но быть высокой, пушистой, войлочной, иметь обильно развитый воздушный мицелий (рис. 76). Линейный рост определяют при изучении влияния температуры, ингибиторов и т. п. при росте гриба на благоприятной среде. При этом учитывают количество ветвлений и скорость роста боковых гиф, перенос питательных компонентов от отдельных клеток гифы к растущему ее концу, подавление ветвления или роста боковых гиф растущим концом главной гифы вследствие, например, конкуренции за источник питания, а также морфологические особенности субстратного и воздушного мицелия и др. (рис. 77).

IV.4.2. ИЗМЕРЕНИЕ ПЛОТНОСТИ ГИФ КОЛОНИИ

Плотность гиф определяют их общей длиной, представляющей суммарную длину главной гифы и ее ответвлений всех порядков, в расчете на единицу поверхности, реже объема колонии. Плотность определяют в разных участках растущей части колонии. Для этого 1 мм² мицелия фиксируют, например, смесью формалина, уксусной кислоты и этилового спирта, окрашивают метиленовым синим, трипан-блау в лактофеноле или другой экспериментально подобранной краской. Поверхность окрашенной периферической части колонии фотографируют под микроскопом. Длину гиф и их плотность измеряют либо при проектировании негативной пленки (увеличение до 200), или же непосредственно на фотографии.

IV.4.3. ИЗМЕРЕНИЕ РАЗМЕРОВ КЛЕТОК ГИФ КОЛОНИИ

Препараты для измерения размеров клеток гиф готовят из воздушного или субстратного мицелия разного возраста, взятого по радиусу из разных участков колонии. Под микроскопом определяют длину (расстояние между двумя перегородками) и ширину клеток главной гифы и ее ветвлений разных порядков, затем находят соотношения длины и ширины клеток главной гифы и ее ветвлений разных порядков. В несептированном мицелии измеряют размеры главной гифы и ее ветвлений разных порядков.

IV.4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОК ГИФ РАСТУЩЕЙ КОЛОНИИ

В препаратах мицелия, взятого из разных участков колонии, определяют наличие живых и мертвых клеток, особенности их морфологии; наличие хламидоспор, клеток хламидоспорового типа и гигантских клеток, появление фрагментов гиф с утолщенными оболочками и т. д. Для характеристики роста и физиологического состояния гриба препараты фиксируют и окрашивают, а затем определяют наличие клеточных структур (ядер, митохондрий) и включений (жира, гликогена, метакроматина и др.).

IV.4.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТА ПО СУХОЙ МАССЕ МИЦЕЛИЯ

Сухую массу мицелия, или общую массу гриба, определяют обычно при культивировании в жидких питательных средах. Для установления интенсивности роста мицелия сухую массу определяют в динамике в среде данного состава, а при изучении влияния на рост различных факторов — в динамике во всех вариантах опытов. Сроки определения сухой массы мицелия зависят от цели исследований и условий культивирования (1—50 и более дней). Первое определение роста осуществляют обычно через 6—12 или 18—24 ч после посева, т. е. после полного прорастания конидий. Желательно сочетать определение интенсивности роста мицелия с комплексным изучением других свойств гриба и культуральной жидкости.

Перед определением сухой массы мицелий освобождают от культуральной жидкости фильтрованием или центрифугированием, затем несколько раз промывают физиологическим раствором и вновь фильтруют или центрифугируют при 2500—3000 об/мин. Мицелий высушивают в сушильном шкафу при температуре 105° С до постоянной массы.

При физиолого-биохимических исследованиях мицелия его отделяют от культуральной жидкости, промывают водой на холоду, центрифугируют в градуированных пробирках, затем часть мицелия отбирают для исследований, а часть — для определения сухой массы и последующего пересчета на всю биомассу.

Рекомендуется параллельно с определением сухой массы мицелия проводить микроскопические исследования, определять характер роста, наличие спороношения, количество живых и мертвых клеток, наличие включений в клетках и др. Проводят многократное микроскопирование средней навески мицелия (из пробы, предварительно подверг-

нутой встряхиванию в шуттель-аппарате) и подсчитывают общее число клеток в счетных камерах или под микроскопом. На основании этих исследований судят о процессах морфогенеза гриба, стадиях роста, биосинтетической активности как общей массы, так и только живых клеток, а также об их соотношении в растущей культуре.

Культуральная жидкость после отделения на холоду от мицелия может быть использована для определения наличия ферментов, токсинов, антибиотиков и других внеклеточных метаболитов, а также для их выделения различными методами.

IV.4.6. МЕТОД МИКРОКУЛЬТУРЫ

На внутреннюю сторону верхней крышки стерильной чашки Петри пипеткой наносят ряды капель жидкой среды Чапека с интервалом до 2 см. Дно нижней чашки покрывают одним — тремя слоями фильтровальной бумаги и смачивают ее 2—3 мл дистиллированной стерильной воды, не допуская чрезмерного увлажнения. Среду инокулируют конидиями перед нанесением капель, а при отсутствии спороношения капли инокулируют мицелием с помощью микологического крючка. Затем чашкой с фильтровальной бумагой накрывают крышку с каплями питательной среды и ставят в термостат при температуре 26—28° С. Возможны различные модификации условий микрокультуры: изменение состава среды, внешних факторов и т. п. При изучении разных факторов роста гриба в микрокультуре (среды и т. п.) капли на крышке нумеруют или помечают каким-либо другим способом [59].

IV.4.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТА ПО ОБЪЕМУ И ЧИСЛУ КЛЕТОК

Рост спор при прорастании определяют по увеличению объема. Готовят взвесь определенной навески спор в определенном объеме воды или питательной среды и подсчитывают в счетной камере их количество в единице объема с последующим пересчетом на общее содержание в навеске или весовой единице (в миллиграммах). Затем взвесь центрифугируют в градуированных пробирках и определяют объем навески до прорастания. По разнице объемов навески спор до и после прорастания определяют увеличение их биомассы, а при пересчете на одну спору — увеличение ее объема во время набухания (с соответствующей поправкой на число проросших спор).

IV.4.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СПОРООБРАЗОВАНИЯ

Интенсивность спорообразования (т. е. увеличение числа клеток) при росте гриба на плотной среде определяют в счетной камере или в нескольких полях зрения микроскопа по количеству спор в определенном объеме взвеси. Для этого блок агаровой культуры определенной площади помещают в определенный объем физиологического раствора или жидкой среды и в течение нескольких минут встряхивают на качалке для освобождения спор и перехода их во взвесь. Блоки агаровой культуры можно брать лабораторным сверлом. При росте гриба в чашках Петри, например, блоки вырезают вдоль линии окруж-

ности. В этом случае определяют интенсивность спорообразования в зависимости от возраста гриба. При взятии блоков вдоль линий окружности на разных расстояниях от центра роста культуры выясняют влияние степени истощения субстрата и других условий на спорообразование [110].

При поверхностном или погруженном культивировании в жидкой питательной среде интенсивность спорообразования определяют по количеству конидий в определенном объеме культуральной жидкости. Пробу культуры, помещенную в жидкую среду, встряхивают на аппарате в течение 15—30 мин и центрифугируют. Время осаждения спор зависит от вида гриба и определяется экспериментально. Из определенной навески осадка спор готовят взвесь и в счетной камере подсчитывают число спор в единице объема.

Густоту взвеси можно измерить нефелометрическим методом, который отличается быстротой и удобен для микробиологических исследований, особенно немицелиального роста грибов. Иногда для этой цели применяют электронные счетчики.

IV.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБОВ

Биосинтетическую активность грибов определяют для характеристики фаз роста гриба при разных способах культивирования, исследования влияния состава субстрата и других факторов на рост культуры и активность образования определенных метаболитов [51, 52].

Показателями биосинтетической активности грибов могут служить их биомасса и синтез продуктов первичного и вторичного метаболизма, определение которого осуществляют различными биохимическими методами. Однако рост мицелия не всегда прямо коррелирует с биосинтетической активностью; в некоторых случаях отмечается обратная зависимость. Наиболее четкая прямая корреляция прослеживается по содержанию белка, НК, активности дыхания, потреблению продуктов питания, выделению метаболитов и ферментов.

IV.5.1. НЕКОТОРЫЕ МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РОСТА И БИОСИНТЕЗА

Скорость роста грибов определяют по увеличению биомассы в единицу времени или по времени, необходимому для удвоения числа клеток. Скорость роста грибов может быть выражена временем образования новой апикальной клетки гифы и ее ветвления или временем образования новых клеток из посевной конидии при дрожжеподобном типе роста или спорообразовании.

На скорость роста влияют внешние факторы, изменение внутриклеточной организации и активность ферментных систем. Специфическая (удельная или относительная) скорость роста определяется приростом биомассы в единицу времени, рассчитанным на единицу растущей биомассы: $\mu = (dx/dt)(1/x)$, где x — биомасса; t — время.

Скорость роста многих видов бактерий и дрожжей определяется концентрацией компонента питательного субстрата, находящегося в минимуме (все остальные компоненты — в избытке), и может быть выражена уравнением Моно, отражающем зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата [710]: $\mu = \mu_{\max} S / (K_S +$

$+ S$), где S — концентрация вещества, находящегося в минимуме; $\mu_{\max}$ — предельная скорость, которая может быть достигнута при увеличении S ; K_S — константа, численно равная концентрации S при удельной скорости, равной $\frac{1}{2} \mu_{\max}$ (рис. 78). Другой тип зависимости роста от концентрации ингибирующих рост продуктов метаболизма выражается уравнением неконкурентного торможения ферментативных

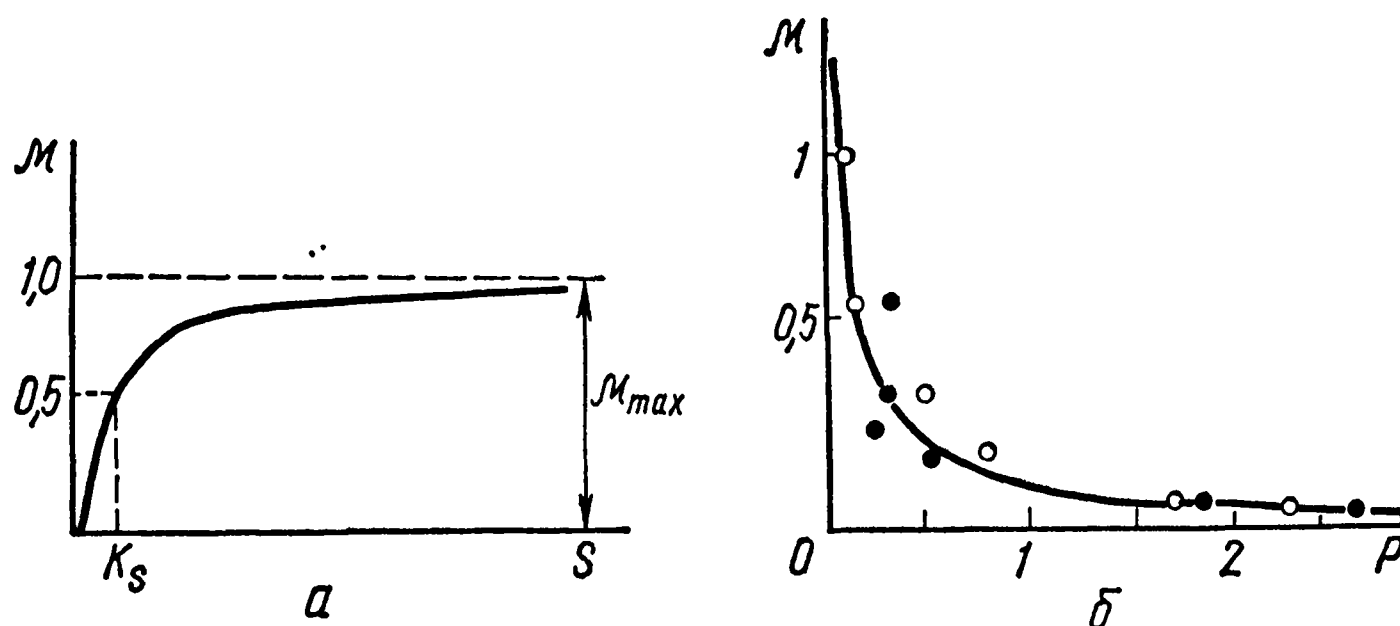


Рис. 78. Зависимость скорости роста бактерий от концентрации лимитирующего субстрата (а) и ингибирующего действия продуктов метаболизма (б) при концентрации кислоты 0,1 моль/л:

●, ○ — концентрация продукта, найденная путем анализа и вычисленная по потребленному лактату соответственно.

реакций [179, 181]: $\mu = \mu_0 K_p / (K_p + P)$, где μ_0 — удельная скорость роста при отсутствии ингибирующих метаболитов; P — концентрация ингибирующих рост метаболитов; K_p — константа, численно равная концентрации, при которой скорость роста равна $1/2 \mu_0$ [181, 347, 377, 458, 730]. В настоящее время предложены многочисленные уравнения зависимости удельной скорости роста от разных факторов [514, 524, 528, 534, 577, 603, 618, 645, 687, 735, 807, 808, 809, 811, 813].

Кинетические модели роста грибов (см. раздел IV.5.3) основываются на знании процессов метаболизма, ферментных систем, метаболитов и факторов, активирующих или ингибирующих отдельные его звенья. Методы математического моделирования служат для установления взаимосвязи между начальными (входными) и конечными (выходными) показателями роста и биосинтетической активности культуры грибов. К ним обычно относят: кинетику роста, образование продуктов метаболизма, автолиз биомассы, инактивацию известных продуктов метаболизма, потребление отдельных компонентов питательной среды, изменение pH, Eh, температуры и т. п. (табл. 8).

Однофакторные кинетические уравнения определяют зависимость скорости роста микроорганизмов от одного фактора, многофакторные — от нескольких. В табл. 9 представлены следующие уравнения [17]:

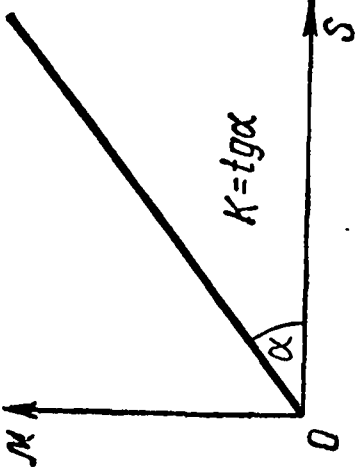
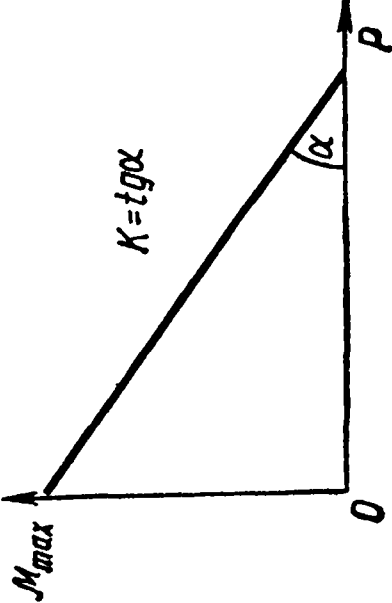
1. Уравнение зависимости удельной скорости роста (μ) от концентрации субстрата (S); K — коэффициент пропорциональности (предельная концентрация субстрата, лимитирующего рост, не учитывается).

2. Уравнение Моно, представляющее зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата. Здесь $\mu_{\max}$ — максимальная удельная скорость роста при $S \rightarrow \infty$; K_S — коэффициент, равный концентрации субстрата при $\mu = 1/2 \mu_{\max}$.

Т а б л и ц а 8. Объекты математического моделирования процессов непрерывного культивирования микроорганизмов [17]

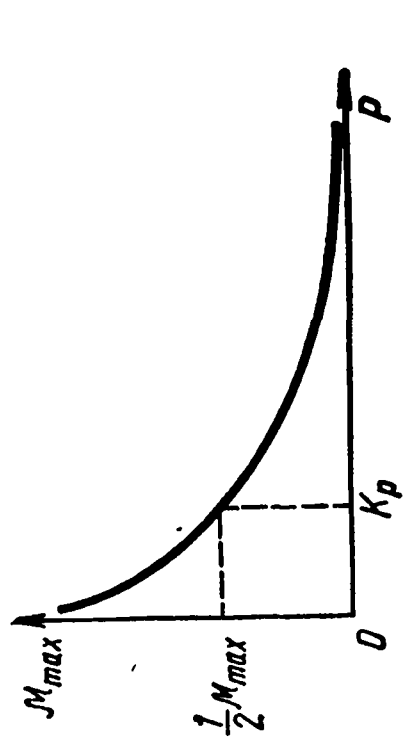
Объект моделирования	Входные переменные	Обозначение	Выходные переменные	Обозначение
Кинетика роста	Концентрация субстрата (в том числе парциальное давление растворенного в среде кислорода) Концентрация продуктов метаболизма (в том числе парциальное давление растворенного в среде углекислого газа) Концентрация биомассы Концентрация водородных ионов Окислительно-восстановительный потенциал Температура Давление	S pO_2 P pCO_2 x pH Eh T P	Удельная скорость роста	μ
Кинетика образования продуктов метаболизма	—		Удельная скорость образования продуктов метаболизма	qP
Кинетика потребления субстратов	—		Удельная скорость потребления субстратов	qS

Т а б л и ц а 9. Математические модели роста и биосинтетической активности бактерий

Зависимость	Уравнение	Графическое изображение
1. Удельной скорости роста от концентрации субстрата	$\mu = KS$	
2. Удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_{S'} + S}$	
3. Удельной скорости роста от концентрации продуктов метаболизма	$\mu = \mu_{\max} KP$	

4. Удельной скорости роста от концентрации ингибирующих продуктов метаболизма

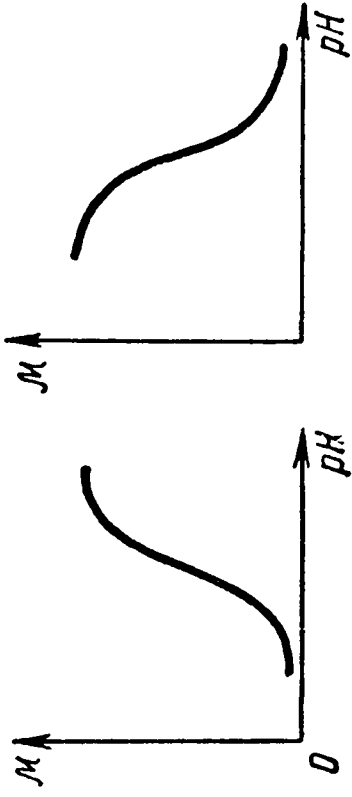
$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{K_p}{K_p + P}$$



5. Удельной скорости роста от значения pH раствора

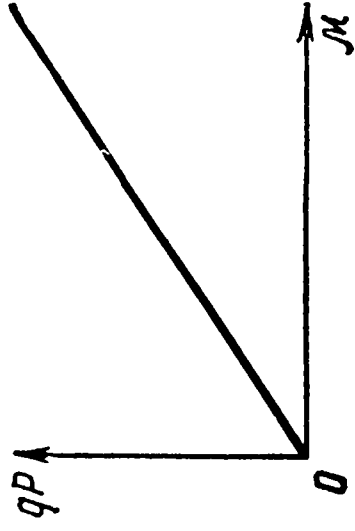
$$\mu = \mu_{\max} \frac{K_H}{K_H + H}$$

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{K_{OH}}{K_{OH} + OH}$$



6. Образования продуктов метаболизма от удельной скорости роста

$$qP = b\mu$$



3. Уравнение зависимости удельной скорости роста от концентрации продуктов метаболизма [577, 618].

4. Уравнение зависимости удельной скорости роста от ингибирующих продуктов метаболизма (конкурентное торможение).

5. Уравнение зависимости удельной скорости роста от значений pH (неконкурентное торможение ионами H^+ и OH^-) [377].

6. Уравнение зависимости образования продуктов метаболизма от удельной скорости роста.

Математические модели роста и биосинтетической активности грибов разрабатываются также для процессов непрерывного культивирования.

IV.5.2. ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА НА СКОРОСТЬ РОСТА

Зависимость удельной скорости роста культуры грибов от концентрации продуктов метаболизма выражается уравнением неконкурентного торможения ферментативных реакций (см. с. 148).

Влияние продуктов метаболизма на скорость роста грибов определяют методом острого опыта [181, 458]: клетки культуры микроорганизма раннего возраста засевают в питательную среду с разной концентрацией известных продуктов метаболизма и в течение нескольких часов определяют скорость их роста. Влияние продуктов метаболизма на скорость роста грибной колонии при поверхностном культивировании на жидкой питательной среде или при погруженном периодическом культивировании изучают также путем добавления разных концентраций известных продуктов метаболизма грибов (токсинов, антибиотиков и др.) к питательной среде. Эффект действия определяют по скорости роста мицелия. Ингибирующее или стимулирующее действие продуктов метаболизма на рост мицелия грибов определяют добавлением к питательной среде определенных количеств фильтрата культуры гриба разного возраста. Таким образом, по сухой массе мицелия или по диаметру колонии устанавливают время появления в культуре продукта метаболизма, максимально ингибирующего рост мицелия.

IV.5.3. КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РОСТА ГРИБОВ

В результате изучения роста и метаболической активности грибов предложено несколько моделей кинетики роста грибов разных классов с учетом интенсивности специфического роста гиф, его влияния на единицу гифального роста, степени растяжимости гифальных апексов.

IV.5.3.1. ЕДИНИЦА ГИФАЛЬНОГО РОСТА

Рост мицелиальных грибов измеряется единицей гифального роста, которая равна отношению общей длины гиф (нм) к числу гифальных кончиков (апексов) в гифе [812]. Для *Geotrichum candidum* эта единица составляет около 100 нм [534] и не зависит от удельной скорости роста, изменяющейся под влиянием температуры, концентрации источников углерода или добавления в среду ингибиторов.

Скорость роста апексов описывается следующим уравнением: $E = 2(H_t - H_0)/(B_0 + B_t)$, где H_0 — начальная общая длина гифы (нм); H_t — увеличение общей длины гиф за 1 ч; B_0 — начальное число апексов; B_t — число апексов через 1 ч.

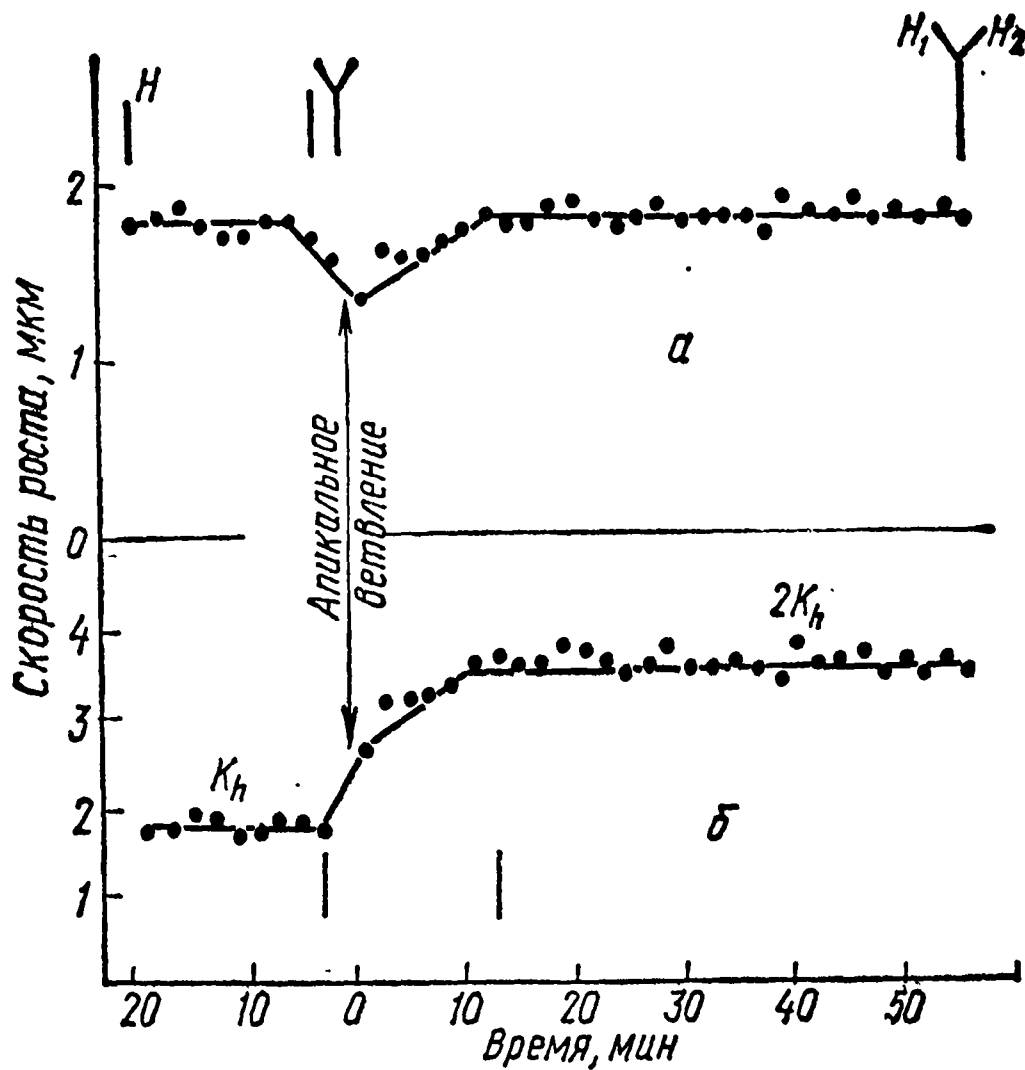


Рис. 79. Скорость роста апексов главной гифы и ветвлений *Geotrichum lactis* $\left(H + \frac{1}{2} (H_1 + H_2) \right)$:

а — начальная фаза роста; б — экспоненциальная фаза роста (K_h — константа роста).

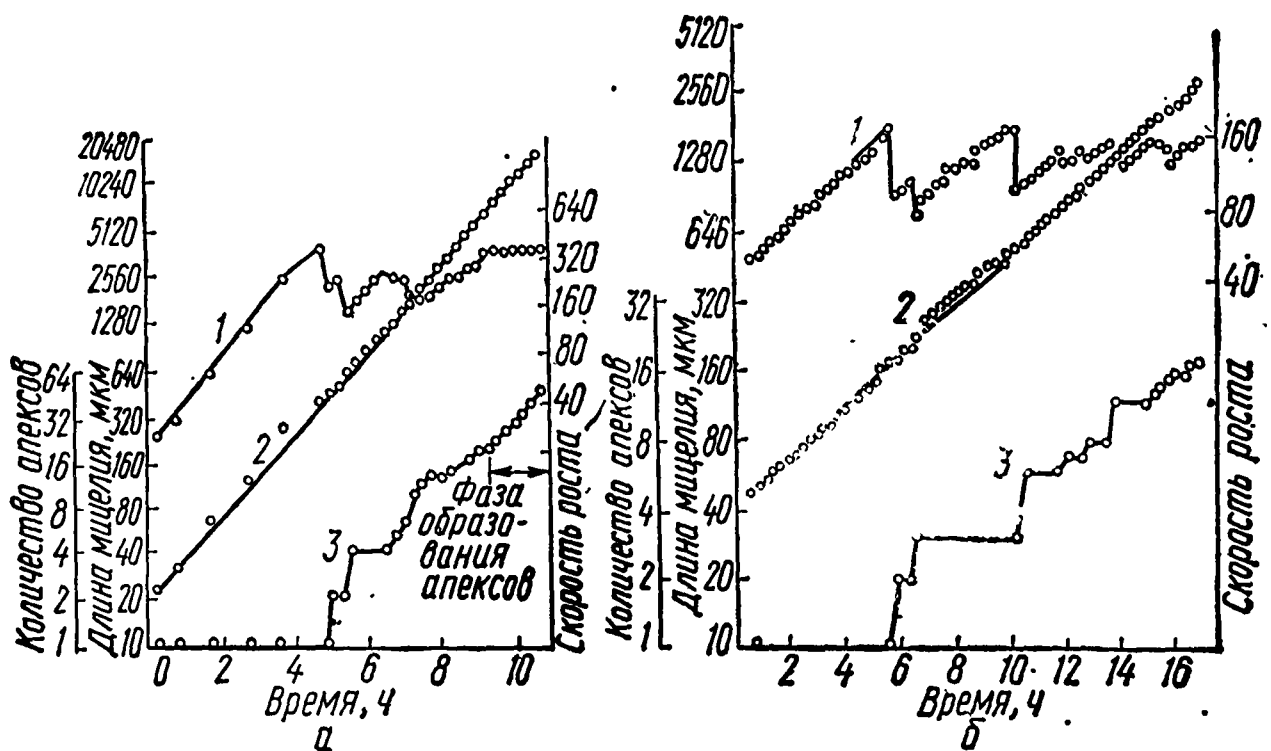


Рис. 80. Скорость роста колоний *Mucor hiemalis* (а) и *Aspergillus nidulans* (б) на мальтозном агаре при 25° С, выраженная в единицах гифального роста:

1 — скорость роста; 2 — общая длина гиф; 3 — количество апексов.

Для определения единицы гифального роста споровую взвесь, диспергированную в 0,1%-ном растворе Твина-80, высевают в чашки Петри на пленку стерильного целлофана (40—60 спор), помещенную на поверхность агаризованной питательной среды. Густота посевной взвеси — приблизительно 40—60 спор на пленку. Чашку Петри фиксируют на столике микроскопа и фотографируют культуру каждые 15 мин. Все приспособления должны находиться в камере с постоянным освещением и температурой. Длину гиф и число ветвлений измеряют при проектировании негативной пленки (увеличение 70—200) либо по фотоотпечаткам.

Боковые ветвления образуются, как правило, ниже перегородки гифы или рядом с ней. В их развитии различают три фазы. В течение первой фазы, продолжающейся 10 мин, скорость роста веточек увеличивается экспоненциально. При достижении определенной скорости роста наступает вторая фаза, которая характеризуется постоянной скоростью линейного роста и продолжается около 44 мин с момента начала ветвления. Причем скорость роста боковых ветвлений у *Geotrichum lactis* на 31% ниже, чем у главных гиф. С наступлением третьей фазы устанавливается постоянная скорость роста апикальных и боковых ветвлений (рис. 79) [524, 808, 811—814]. У *Aspergillus nidulans* скорость роста главной гифы не зависит от образования ветвлений, а скорость роста ветвлений увеличивается вплоть до достижения постоянной скорости и продолжается около 28 мин с момента начала ветвления. Скорость линейного роста боковых ветвлений на 21% ниже, чем главной гифы (рис. 80, а).

IV.5.3.2. СКОРОСТЬ РОСТА КОЛОНИИ

Радиальный рост колонии грибов и рост неразветвленной гифы при постоянном уровне K_p описываются уравнением $R_1 = R_0 + K_p \times (t_1 - t_0)$, где R_1 — радиус колонии или длина гиф в момент времени t_1 ; R_0 — радиус колонии при первом измерении в момент t_0 ; K_p — константа скорости роста, которую рассчитывают на основании измерений, проводимых каждые 15 мин в течение 9—18 ч. Для измерений используют микрофотографии периферической зоны колоний при увеличении 300, 650; плотность определяют на участках площадью 100—1000 нм с интервалами 500 нм. Повторность измерений — 4—6-кратная.

Скорость прорастания спор грибов определяют временем достижения ростковой трубкой длины 150 нм, т. е. до образования первого ветвления. Время удвоения длины ростковой трубки прорастающей споры у разных видов грибов различно, но, как правило, оно меньше времени удвоения длины гифы (рис. 80, б).

IV.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБОВ

Биосинтетическая активность грибов при культивировании с целью получения определенного продукта первичного или вторичного метаболизма определяется скоростью его образования и максимальным выходом на единицу используемого субстрата. В самом общем виде биосинтетическая активность определяется количеством веществ, по-

требленных на образование единицы биомассы или определенного метаболита за единицу времени. Следовательно, этот показатель тесно связан с ростом и физиолого-биохимическими особенностями гриба. Рост и биосинтетическая активность зависят от степени пригодности отдельных компонентов среды. Пригодность различных источников питания и определяют по скорости линейного роста мицелия и накоплению максимальной массы. При росте культуры на средах с хорошо усвояемыми источниками углерода лаг-фаза, или фаза адаптации, как правило, отсутствует или сокращается до минимума, и максимальной массы мицелий достигает на более ранней стадии развития культуры. Обычно пригодность источников углерода определяют по приросту массы мицелия на единицу использованного источника углерода и количеству углерода, вошедшего в состав мицелия (если это можно определить) [514, 687, 735, 739].

IV.6.1. ЭКОНОМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ

Степень превращения источника углерода определяют экономическим коэффициентом (Y), который представляет собой отношение сухой массы мицелия (С.м.м.) в определенном объеме среды к количеству потребленного источника углерода (исп. С): $Y = (\text{С.м.м. (г, мг)} / \text{исп. С (г, мг)}) \times 100 (\%)$. Экономический коэффициент зависит от видовых особенностей гриба, возраста культуры, условий культивирования (состава среды, аэрации, способа выращивания) и характера энергетических процессов в клетке (при дыхании — высокое значение, при брожении — низкое). Наибольших значений экономический коэффициент достигает при минимальном выделении углекислоты и растворимых метаболитов в среду. Интенсивность потребления углерода определяется дыхательным коэффициентом — отношением количества выделенной углекислоты к поглощенному кислороду: $(\text{CO}_2 \text{ (мкл)} / \text{O}_2 \text{ (мкл)}) \cdot 100\%$. Для этой цели в аппарате Варбурга изучают дыхание клеток, их гомогенатов и бесклеточных экстрактов. Эндогенное дыхание клеток (способность окислять запасные метаболиты и субстраты) определяют с помощью биохимического анализа продуктов, образуемых в процессе окисления субстрата, что позволяет выяснить характер его изменения [109]. Скорость поглощения кислорода характеризуется коэффициентом Q_{O_2} , показывающим количество поглощенного кислорода (в микролитрах) за определенное время на единицу клеточной массы (аналогичный коэффициент характеризует количество выделенной углекислоты). Кроме дыхательного коэффициента и скорости поглощения кислорода для характеристики процессов метаболизма можно использовать другие показатели:

$Q_{O_2} (N)$ — количество кислорода, поглощенного за определенное время (обычно за 1 ч) на 1 мг или 1 мкг азота клеток (общего, белкового, аминокислотного и др.);

$Q_{O_2} (P)$ — количество поглощенного кислорода, рассчитанное на 1 мг или 1 мкг фосфора клеток (или соединений фосфора — РНК, ДНК, АТФ и др.);

$Q_{O_2} (C)$ — количество поглощенного кислорода, рассчитанное на 1 мг или 1 мкг общего углерода клеток (или его соединений — углеводов, липидов и т. д.);

$Q_{O_2} (\text{клетка})$ — количество кислорода, поглощенного одной клеткой.

IV.6.2. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ

Скорость потребления субстрата культурой в определенный отрезок времени выражается уравнением: $dS/dt = qx$, где x — биомасса; t — время; S — концентрация субстрата; q — метаболический коэффициент, соответствующий удельной скорости метаболизма. Этот коэффициент отражает ферментативную активность гриба и используется для характеристики потребления глюкозы ($q_{\text{глюкоза}}$), кислорода (q_O) и др. (q — величина постоянная при неизменяющихся условиях). Метаболический коэффициент используют также для определения скорости образования продуктов метаболизма культуры, в том числе вторичных.

Для характеристики процессов метаболизма на разных фазах роста и биосинтеза гриба могут быть использованы и другие показатели: 1) потребленный кислород/потребленная глюкоза; 2) потребленный кислород/общий или белковый азот; 3) общий азот/сухая масса; 4) РНК/ДНК; 5) белок/РНК; 6) содержание метаболита в клетке/общий биосинтез.

Манометрический метод определения интенсивности дыхания в сочетании с биохимическими методами анализа промежуточных продуктов окисления позволяет получить представление о метаболической активности гриба.

IV.6.3. ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКАХ И ИХ СТРУКТУРАХ

Являясь гетеротрофными организмами, грибы способны использовать для своего роста и развития огромное количество разнообразных органических соединений, главным образом растительного происхождения. В результате сложных и многоступенчатых окислительно-восстановительных реакций эти вещества при аэробном окислении разлагаются до углекислого газа и воды, а при анаэробном окислении — до продуктов неполного окисления.

Способность большинства сапрофитных и полупаразитных грибов расти на питательных средах, состоящих из сравнительно простых веществ: источника углерода (обычно углеводы или близкие к ним вещества), минерального азота (нитратный или аммиачный) и необходимых минеральных элементов, делает их весьма удобной моделью для многих физиологических исследований [676, 716].

В процессе роста гриба изменяются структура и состав компонентов клеток, скорость образования и характер метаболитов. Исследование состава, структуры, локализации и функции химических компонентов в грибной клетке проводят на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. В соответствии с этим изучают: 1) интактные или растущие клетки мицелия; 2) гомогенаты их в соответствующих буферных растворах; 3) клеточные оболочки, получаемые при разрушении клеток грибов; 4) органеллы клеток — протопласты, митохондрии, рибосомы и другие, обычно получаемые путем дифференциального центрифугирования; 5) растворимые компоненты, в том числе и высокомолекулярные соединения (НК, белки и др.), остающиеся при центрифугировании в надосадочной жидкости.

Изучение метаболизма в субклеточных структурах предполагает предварительное разрушение клеток гриба, выделение клеточных органелл в гомогенном и нативном состояниях.

IV.6.3.1. МЕТОДЫ РАЗРУШЕНИЯ ГРИБНОЙ КЛЕТКИ

Разрушение грибных клеток представляет значительные трудности в связи с устойчивостью их оболочек. В микробиологии и других областях биологии применяют разные методы разрушения клеточной оболочки: ферментативное переваривание (при получении протопластов), действие ультразвука, попеременное замораживание и оттаивание, осмотический шок, или плазмолиз, разрушение мицелия (в гомогенизаторах или путем растирания с кварцевым или стеклянным песком). Последний метод применяют чаще всего, хотя он и не всегда обеспечивает высокий процент разрушения клеток.

Механическое разрушение. Применяют для получения гомогенатов, в которых отдельные компоненты клетки распределены относительно равномерно. Определенную навеску мицелия растирают на холоду (4—5° С) в определенном объеме буферного раствора, выбор и концентрация которого устанавливают экспериментально [447].

Ферментативное разрушение. Для изучения строения и химического состава, а также для выделения протопластов клеточные оболочки грибов разрушают с помощью ферментативного гидролиза или лизиса. Продукты различной степени гидролиза клеточных оболочек анализируют хроматографическими и химическими методами. Лизис (растворение) клеточных оболочек осуществляют путем воздействия ферментов, способных последовательно гидролизовать слои полимера в матрице оболочки. К числу ферментов, используемых для полного или частичного лизиса клеточной оболочки, относятся α - и β -глюканазы, протеазы и пептидазы, хитиназы, гексозаминидазы, целлюлазы, глюкуронидазы, липазы и др.

При действии комплексных литических ферментов (например, выделенных из улитки *Helix pomatia* или из некоторых видов стрептомицетов) в гифах грибов могут образоваться одна или несколько пор, через которые выходят протопласты. Их размеры меньше, чем у получаемых при лизисе клеточной оболочки; они способны к регенерации, а также агрегации в более крупные сферические образования.

Применяя различные комбинации высокоочищенных гидролитических ферментов и действуя ими в определенной последовательности, изучают особенности «архитектурного» строения клеточной оболочки, выделяют протопласты и некоторые органеллы клетки [497].

Протопласты некоторых видов грибов можно выделить и без разрушения клеточной оболочки — они выходят из верхушечных клеток гиф или конидий, обычно при росте на жидкой среде. Фильтрованием среды через стерильный стеклянный фильтр протопласты отделяют от мицелия, а оставшиеся во взвеси протопласты осаждают центрифугированием. В качестве стабилизаторов протопластов применяют растворы сахаров или минеральных солей (0,2—1 М).

IV.6.3.2. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

Для фракционирования субклеточных структур из гомогенатов клеток используют несколько методов [362].

1. Дифференциальное центрифугирование в растворах сахарозы определенной концентрации.

2. Разделение субклеточных структур по скорости седиментации в растворах сахарозы, концентрация которых возрастает от мениска жидкости ко дну пробирки (дифференциальное центрифугирование в сахарозном градиенте). Важное значение при этом имеют правильное

приготовление градиентных растворов сахарозы с постепенно меняющейся концентрацией, образующихся при смешении двух основных растворов с высокой (50%) и низкой (5%) концентрацией; последовательное наслаивание менее плотных растворов на более плотные. Градиентные растворы сахарозы готовят в специальных приборах или с помощью пипетки вносят в пробирку менее плотные растворы известной концентрации на более плотные (например, вносят последовательно определенные порции 30-, 25-, 20-, 15-, 10%-ных растворов сахарозы, затем наслаивают гомогенат). Клеточные компоненты разделяют в градиентных растворах сахарозы путем центрифугирования гомогенатов.

3. Разделение субклеточных структур в зависимости от их плотности в растворах возрастающего удельного веса — изоплотностное градиентное центрифугирование.

4. Разделение субклеточных структур на зоны в зависимости от скорости седиментации и плотности частиц — зональное центрифугирование.

5. Изоплотностное центрифугирование в растворах сахарозы определенной плотности, приводящее к флотации или седиментации частиц определенной плотности.

IV.6.3.3. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Сущность метода заключается в седиментационном разделении клеточных органелл разных размеров. Разделение проводят в ультрацентрифугах с ускорением до 250 000—300 000 g. Скорость осаждения субклеточных структур в гравитационном поле определяют по уравнению: $dx/dt = \frac{2}{9} [r^2 (d_p - d_m)g/\eta]$, где x — расстояние (см), пройденное частицей по направлению центробежной силы за время t (с); d_p — плотность частиц (г/см³); d_m — плотность среды разделения (г/см³); η — вязкость суспензионной среды (П); g — гравитационное ускорение (см/с²); r — радиус частицы (см); $\frac{2}{9}$ — поправочный коэффициент для частиц шарообразной формы.

Если $d_p > d_m$, частицы седиментируются, если $d_p < d_m$ — флотируют, при $d_p = d_m$ — остаются неподвижными. Константу седиментации, т. е. скорость осаждения на единицу ускорения центробежной силы, вычисляют по формуле

$$\bar{S} = \frac{3,9 \cdot 10^{-5} R_{cp} \ln \frac{R_{max}}{R_{min}}}{S_0^t g_{cp} dT},$$

где $\bar{S}$ — константа седиментации наименьших частиц, полностью седиментирующихся при данных условиях; R_{max} — расстояние от оси вращения центрифуги до дна пробирки; $R_{cp} = (R_{min} + R_{max})/2$; R_{min} — радиус расстояния от оси вращения центрифуги до средней точки мениска столба жидкости центрифужной пробирки;

$$S_0^t g_{cp} dT = \frac{9}{2} \frac{3,9 \cdot 10^{-5} R_{cp} \ln \frac{R_{max}}{R_{min}}}{r^2 (d_p - d_m)} \eta,$$

$S_0^t g_{cp} dT$ — условия, необходимые для полного осаждения частиц. Для пересчета в единицы Сведберга (S) полученные значения умножают

на 10^{13} . Если время ускорения и замедления вращения центрифуги незначительно по сравнению с временем центрифугирования при постоянной скорости, расчет производят по упрощенным формулам

$$\bar{S} = \frac{3,9 \cdot 10^{-5} R_{\text{cp}} \ln \frac{R_{\text{max}}}{R_{\text{min}}}}{g_{\text{cp}} T} ;$$

$$T = \frac{2}{9} \frac{3,9 \cdot 10^{-5} R_{\text{cp}} \frac{R_{\text{max}}}{R_{\text{min}}}}{g_{\text{cp}} r^2 (d_p - d_m)} ,$$

где T — время, необходимое для полного осаждения частиц с радиусом r при центробежном ускорении g_{cp} . Пользуясь приведенными формулами, рассчитывают примерные условия осаждения и размеры любого класса шарообразных частиц, полностью осаждающихся при данных условиях [362].

Разделение субклеточных компонентов достигается увеличением скорости центрифугирования либо градиента концентраций используемых растворов. В обоих случаях сначала оседают более тяжелые частицы, затем — более легкие. При центрифугировании клеточные компоненты распределяются в пробирке слоями (в соответствии с их плотностью и другими физико-химическими свойствами) и могут быть отделены для дальнейшего изучения. При первом центрифугировании (1000—3000g; 10—15 мин) выделяют компоненты с примерно одинаковой плотностью. Последующее центрифугирование в градиенте плотности позволяет выделить эти частицы в чистом виде. Митохондрии грибов осаждаются при скорости центрифугирования 10 000—15 000g в течение 30—60 мин. Несколько раньше осаждается гликоген; липиды обнаруживают на поверхности надосадочной жидкости.

Фракции частиц разрушенных клеток или клеточных компонентов, осаждающихся при 10 000—15 000g в течение 15—30 мин, представлены структурами, видимыми в световом микроскопе. Надосадочная жидкость является молекулярной фракцией, которая содержит растворимые молекулы сложных полимеров — белков, НК и др. [362].

Выделенные в результате дифференциального центрифугирования клеточные органеллы сохраняют свою морфологическую и функциональную целостность. Современные методы позволяют поддерживать функционирование отдельных органелл *in vitro*.

Дифференциальное центрифугирование широко используют для исследования особенностей цитологии, физиологии и биохимии грибной клетки. Данные, полученные этим методом, совпадают с данными, полученными при исследованиях на целых клетках.

IV.6.3.4. СЕДИМЕНТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ДРУГИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

Седиментационный анализ служит для определения степени гомогенности субклеточных фракций и необходимости дальнейшего их разделения на субфракции. Контроль гомогенности субклеточных структур осуществляют микробиологическими, иммунологическими, химическими и биохимическими (ферментативными) методами. Для наблю-

дения за процессом седиментации и определения границ оседания частиц разной плотности применяют оптические методы — нефелометрию, турбидометрию, рефрактометрию и др.

Молекулярную массу частиц определяют методом седиментационного равновесия на ультрацентрифугах, снабженных интерференционными оптическими системами.

Прежде всего в гомогенате определяют степень разрушения клеток. Наличие митохондрий в осадке субклеточных структур определяют цитохимическим методом: например, в суспензию субклеточных структур в 0,25 М растворе сахарозы добавляют раствор януса зеленого до разведения 1 : 200 00 — 1 : 100 00, осаждают суспензию центрифугированием и через некоторое время микроскопируют осадок. Митохондрии окрашиваются в розовый цвет и хорошо видны на фоне остальных элементов клетки, окрашенных в голубой цвет. При окраске растворами солей тетразолия митохондрии обнаруживаются по наличию окрашенных нерастворимых гранул формаза.

Цитохимические методы позволяют определить локализацию веществ в неразрушенной клетке гриба, а в некоторых случаях — в живых клетках. Эти методы основаны на разном поглощении структурами клетки световых лучей или способности структурных компонентов образовывать с определенными веществами окрашенные соединения, содержание которых определяют колориметрическими методами.

При цитохимических исследованиях грибной клетки большое значение имеет выбор метода фиксации препарата, вызывающий наименьшие изменения в клетке. В качестве фиксаторов используют пары осмиевой кислоты, формалина, этанола, эфира, применяют также кратковременную термическую фиксацию на пламени горелки.

Электронно-микроскопическое изучение препаратов субклеточных фракций дает представление о тонкой структуре клеточных элементов, гомогенности осадка и составе клеточных структур. Электронно-микроскопический контроль чистоты фракций и целостности органелл помогает установить взаимосвязь их структуры и функции.

Химический метод основан на определении специфических соединений отдельных субклеточных структур. Так, значительное содержание ДНК (более 90%) характерно для фракции ядер, присутствие ДНК в других клеточных фракциях в значительном количестве указывает на их негомогенность. Наличие цитохрома С характерно для митохондриальной фракции, цитохрома В₅ — для микросомальной.

Иммунологические методы обычно связаны с предварительной иммунизацией животных. Их применяют для определения чистоты белков [362].

IV.6.3.5. ФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

Эти методы отличаются специфичностью, быстротой, возможностью исследования сравнительно малых количеств материала. В основе их лежит определение активности специфических (индикаторных, маркерных) для отдельных субклеточных фракций ферментов (табл. 10). По активности специфических ферментов определяют степень повреждения субклеточных структур в процессе их выделения или в результате воздействия других факторов, вызывающих солюбилизацию (выход ферментов из структур). Для более полной характеристики субклеточных структур определяют активность нескольких специфических ферментов.

Т а б л и ц а 10. Органеллоспецифические ферменты клеток печени [362]

Субклеточная фракция	Индикаторный фермент
Ядерная	НАД-пирофосфорилаза
Митохондриальная	Сукцинатдегидрогеназа
	Цитохромоксидаза
	Глутаматдегидрогеназа
Лизосомальная	Кислая фосфатаза
	Кислая РНКаза
	Кислая ДНКаза
	Катепсин
	Арилсульфатазы А и В
Уратоксидазные частицы	β-Гликозидаза
	Уратоксидаза
	Оксидазы D-аминокислот
Микросомальная	Каталаза
	Глюкозо-6-фосфатаза
	Неспецифическая холинэстераза
	Антимицин-резистентная
Клеточный сок	НАДН-цитохром-С-редуктаза
	Аланинаминотрансфераза
	Альдолаза
	Лактатдегидрогеназа

IV.6.3.6. МЕТОД ИНГИБИТОРОВ

Ингибиторы, или метаболические яды, применяют для изучения метаболизма веществ. Их действие основано на торможении определенных ферментативных реакций, синтеза и превращения веществ. Например, флюорид и йодацетат считаются ингибиторами ЭМП. Но так как многие ферменты начальных стадий метаболизма являются общими для ЭМП, ПФП и ЦТК, необходимо параллельное определение продуктов, не участвующих в реакции торможения — иначе трудно выяснить механизм метаболизма глюкозы и пути его торможения при данных условиях культивирования. Ингибирование гликолиза флюоридом с накоплением в реакционной смеси фосfogлицерата свидетельствует о наличии ЭМП, но, если необходимые для энолазы ионы Mg^{2+} накапливаются в реакционной смеси в виде нерастворимого магнийфлюорофосфата, можно предположить наличие ПФП. Некоторые метаболические яды оказывают множественное действие в зависимости от их концентрации. Так, флюорид блокирует у *Asp. terreus* — продуцента итаконовой кислоты — превращение пирувата в итаконовую кислоту в концентрации, которая слабо или почти не тормозит превращение глюкозы в пируват. Ингибирующее действие метаболических ядов, следовательно, зависит от степени устойчивости к ним организма или его способности к изменению путей метаболизма (переходу от аэробного к анаэробному, или прямому, пути окисления субстрата) [260, 478].

Специфические ингибиторы применяют для изучения субстратной специфичности ферментов, механизма их действия, природы функциональных групп (активного центра) и регуляции ферментативных

реакций. Различают ингибиторы необратимого и обратимого действия. С помощью ингибиторов обратимого действия получают количественные характеристики ферментативных реакций. Обратимое действие ингибиторов может быть конкурентным и неконкурентным. В первом случае специфический субстрат и ингибитор конкурируют за центр связывания в молекуле фермента (например, конкурентное ингибирование малоновой кислотой сукцинатдегидрогеназы в реакции дегидрирования янтарной кислоты до фумаровой в ЦТК; сукцинатдегидрогеназа — флавопротеид, осуществляющий дегидрирование при наличии в реакционной смеси соответствующих акцепторов—цианистого железа, феррицитохрома *c* и др.). Малоновая кислота связывается с сукцинатдегидрогеназой и тем самым делает невозможным окисление янтарной кислоты. Обратимость этого процесса зависит не от концентрации веществ, а от соотношения субстратов (сукцината и малоната) в реакционной смеси. Например, при соотношении содержания ингибитора (малоновой кислоты) к субстрату (сукцинату) 1 : 50 активность сукцинатдегидрогеназы ингибируется на 50% независимо от абсолютной концентрации реагентов.

Цианид калия является ингибитором цитохромоксидазы, в его присутствии проявляется активность сукцинатдегидрогеназы, устойчивой к действию этого ингибитора. Реакционная смесь для определения активности сукцинатдегидрогеназы в этом случае состоит из (мкмоль): 3 нейтрализованного цианистого калия; 40 сукцината натрия; 3 феррицианида калия, растворенного в 0,1 мл фосфатного буфера, рН 7,2; объем смеси доводят до 2,8 мл. В смесь добавляют 0,2 мл экстракта клеток мицелия и определяют оптическую плотность при 400 нм. Контроль — вода. Единица активности ингибитора — понижение оптической плотности в единицу времени при 20° С.

Неконкурентные ингибиторы реагируют не с центром связывания фермента с субстратом, а с другими участками молекулы фермента. Наиболее известный пример — неконкурентное ингибирование ионами тяжелых металлов (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+}) SH-групп. В присутствии этих ингибиторов образуются меркаптидные формы реагентов, связанные с ионами металлов. Ферменты, для проявления активности которых необходимы ионы определенных металлов (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+}) неконкурентно ингибируются агентами, связывающими эти ионы. Например, ЭДТА, который связывает ионы магния, является неконкурентным ингибитором ферментов, активность которых также зависит от присутствия магния.

Ингибиторы необратимого действия связывают молекулы ферментов или существенно нарушают их структуру. К ним относятся алкилирующие вещества (например, йодацетальдегид), яды нервно-паралитического действия, некоторые инсектициды, фунгициды, токсины и др.

Применение специфических ингибиторов позволяет определить состав цитохромной системы клетки: ингибирование активности цитохрома *a* окисью углерода снимается видимым светом, цианид и сероводород ингибируют комплекс цитохром *a* + *a*₃ и др. [85, 260].

IV.6.3.7. МЕТОД МУТАНТОВ

Для изучения метаболизма на отдельных стадиях развития гриба используют ауксотрофные, или дефицитные по потребности в определенных экзогенных соединениях, мутантные формы грибов, а также

мутанты, по процессам метаболизма. Например, мутант *Neurospora crassa* [671], у которого блокирован метаболизм пирувата, обладает высокой активностью ферментов ПФП. Использование мутантов этого же гриба с нарушением определенной стадии обмена аминокислот позволяет проследить разные пути метаболизма последних (см. раздел XIV.2).

IV.6.3.8. МЕТОД РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ

Метод изучения метаболических процессов в клетке. Радиоактивную метку вводят в молекулу метаболита или его предшественника, не нарушая их структуру и функции. Меченые вещества-предшественники вносят в полноценную питательную среду на определенной фазе роста гриба. Затем определяют количество и локализацию меченого вещества в структурных компонентах клетки.

В качестве метчиков применяют изотопы фосфора ^{32}P (изучение обмена макроэргических соединений, фосфолипидов и других фосфосодержащих соединений, НК), углерода ^{14}C (изучение структуры органических соединений), трития ^3H (выяснение тонкой субклеточной организации органических соединений). Выбор радиоактивного изотопа определяется характером изучаемого биохимического процесса. Например, для изучения синтеза НК применяют меченные по фосфору, углероду или водороду предшественники — пуриновые и пиримидиновые основания, глюкозу, нуклеозиды; для определения включения серосодержащих аминокислот (метионина, цистеина) эти аминокислоты метят по сере.

Опыты проводят в специально оборудованных лабораториях с соблюдением правил защиты [182].

IV.6.3.9. МЕТОД РАДИОГРАФИИ [150]

Метод основан на регистрации радиоактивного излучения с помощью фоточувствительных материалов и позволяет: 1) проследить локализацию и продвижение меченого радиоактивными изотопами предшественника в системе, включение его в ядро, цитоплазму и другие структуры клетки; 2) обнаружить радиоактивное соединение при его минимальной концентрации (высокая чувствительность реакции). Излучение радиоактивных изотопов регистрируют с помощью специальных эмульсий с повышенным содержанием мелких кристаллов бромидов серебра с большой плотностью насыщения ими желатина. При экспонировании на свету происходит реакция, аналогичная фотохимической, в результате которой образуется восстановленное серебро (скрытое изображение). При проявлении эмульсии в участках скрытого изображения образуют скопления гранул восстановленного серебра разных размеров, различаемые в световом микроскопе.

Обычно используют изотопы ^{14}C и ^3H как элементы, входящие в состав всех классов органических соединений. Работа с радиоактивными изотопами предполагает ряд последовательных этапов:

I — в культуральную среду вводят меченный изотопом предшественник метаболита. Желательно при этом, чтобы доза изотопа была невелика при сравнительно высокой радиоактивности.

II — клетки фиксируют через определенные промежутки времени после введения метаболита с меченым атомом. В качестве фиксатора рекомендуют смесь спирта с ледяной уксусной кислотой (3 : 1, 10—15 мин).

III — готовят препарат к покрытию ядерной эмульсией, обезвоживая его проводкой через серию спиртов восходящей концентрации.

IV — препараты покрывают эмульсией.

Все остальные процедуры проводят в фотолаборатории (можно использовать желто-зеленый светофильтр № 117 или 118 при максимально возможном удалении от него).

Применяют ядерные эмульсии двух типов: М — мелкозернистая, Р — крупнозернистая (ГосНИИХИМфотопроект, Москва). Обычно препараты погружают в расплавленную эмульсию в химическом стакане, установленном в термостатируемой водяной бане при $37 - 38^{\circ}\text{C}$. Эмульсию разбавляют дистиллированной водой 1 : 1 ($37 - 38^{\circ}\text{C}$). Затем препараты извлекают, дают стечь эмульсии и сушат 3—8 ч, складывают в коробки, обернутые черной бумагой, и хранят в темном помещении. Экспозицию устанавливают экспериментально.

V — препараты проявляют аминовым или метилгидрохиноновым проявителем. Состав проявителя (г): 2 метола; 75 сульфата натрия безводного или 150 (кристаллического); 8 гидрохинона; 40 карбоната натрия безводного или 100 кристаллического; 5 бромида калия на 1 л воды. Ингредиенты растворяют в указанной последовательности в дистиллированной воде ($40 - 50^{\circ}\text{C}$). Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой в холодильнике и перед употреблением разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 2. Препараты проявляют в течение 3—4 мин, затем промывают водой, фиксируют в течение 5—8 мин в 30%-ном растворе тиосульфата натрия. Температура проявителя и фиксатора не должна превышать $10 - 20^{\circ}\text{C}$, после фиксации препарат промывают проточной водой в течение 10—15 мин.

VI — отмытые препараты окрашивают в зависимости от цели исследования цитохимическими красителями, проводят через серию спиртов восходящей концентрации, затем через карбол — ксилол (2—3 повторности) и заключают в бальзам. Приготовленные препараты исследуют под микроскопом и определяют локализацию и содержание меченого элемента в клетке. В последнем случае необходима стандартизация условий приготовления препаратов: одинаковая удельная активность и доза меченого предшественника, определенное время фиксации, обработка одной эмульсией и др. В препаратах подсчитывают число зерен серебра на единицу площади исследуемой части клетки (ядра, цитоплазмы) [150].

V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ГРИБОВ

V.1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Наука о ферментах, или ферментология, является одним из наиболее бурно развивающихся направлений биохимии. Это объясняется прежде всего ролью, которую играют ферменты в биологическом обмене веществ, а также все более интенсивным применением ферментативных препаратов в различных отраслях народного хозяйства. Реакции, катализируемые ферментами, характеризуются более низкой энергией активации, чем соответствующие реакции, катализируемые ионами H^+ , OH^- и другими неорганическими и органическими катализаторами. В среднем ферменты снижают энергию активации на 16 — 18 ккал/моль. Только благодаря тонкой специфичности ферментативных катализаторов возможны строгая упорядоченность и взаимосвязь реакций, лежащих в основе обмена веществ.

V.1.1. ТИПЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Различают несколько основных типов специфичности ферментов [132, 236, 464].

Абсолютная специфичность: ферменты, катализирующие превращение только одного субстрата. Например, уреаза расщепляет мочевину на углекислый газ и аммиак; глюкозооксидаза катализирует окисление β -D-глюкозы с образованием глюконовой кислоты и перекиси водорода.

Групповая специфичность: ферменты, действующие на ряд субстратов или ряд связей при условии, что в молекуле субстрата присутствуют атомные группировки определенного типа. Так, все протеолитические ферменты расщепляют пептидные связи ($CO-NH$). Однако трипсин гидролизует только те пептидные связи, карбонильная группа ($C=O$) которых принадлежит аминокислотам — аргинину и лизину; химотрипсин предпочтительнее действует на пептидные связи, образованные карбонильной группой тирозина или фенилаланина и т. д.

Специфичность по отношению к определенным типам реакций: ферменты с наименьшей специфичностью, катализирующие определенные типы реакций независимо от того, какие атомные группировки присутствуют вблизи той связи в молекуле субстрата, на которую действует фермент. Так, липазы катализируют гидролиз любых сложных эфиров, включая и липиды. Однако скорость реакций в некоторой степени зависит от длины углеродной цепи.

Стереохимическая специфичность: ферменты, катализирующие превращение только одного стереоизомера субстрата. Например, лактатдегидрогеназа катализирует окисление лишь *L*-молочной кислоты. Подобной стереоспецифичностью обладают также глутаматдегидрогеназа, аспарагиназа и некоторые другие.

V.1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Известно свыше 1000 различных ферментов. Согласно классификации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов их разделяют на шесть классов [332]:

1. *Оксидоредуктазы* — окислительно-восстановительные ферменты.
2. *Трансферазы* — ферменты, катализирующие перенос различных групп атомов с одной молекулы на другую.
3. *Гидролазы* — ферменты, катализирующие гидролитические реакции.
4. *Лиазы* — ферменты, которые отщепляют от субстрата ту или иную группу (не путем гидролиза) с образованием двойной связи или, наоборот, присоединяют группы к двойным связям.
5. *Изомеразы* — ферменты, катализирующие изомеризацию органических соединений.
6. *Лигазы*, или синтетазы, — ферменты, которые катализируют синтетические реакции, сопровождающиеся отщеплением остатков фосфорной кислоты от АТФ или аналогичного трифосфата.

Каждый из этих классов подразделяется на подклассы, а последние в свою очередь на более мелкие группы.

V.1.3. ЕДИНИЦЫ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Любой ферментный препарат прежде всего характеризуется ферментативной активностью. По рекомендации комиссии Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов единицей ферментативной активности принята стандартная единица фермента [332].

Стандартная единица фермента (*E*): количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при заданных условиях. Как правило, в качестве таких условий выбирают оптимум pH, избыток субстрата (с тем, чтобы фермент был насыщен) и определенную температуру (20 или 37° С). Активность фермента желательно определять на начальной стадии катализа. Если известна начальная скорость ферментативной реакции и, следовательно, активность фермента, можно рассчитать и удельную активность фермента или ферментного препарата.

Удельная активность: число единиц фермента, отнесенное к 1 мг белка.

Молярная активность: число молекул данного субстрата или эквивалентов затронутых групп, превращаемых за 1 мин одной молекулой фермента (или в пересчете на активный центр) при оптимальной концентрации субстрата.

V.1.4. СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Присутствие фермента обнаруживают либо по накоплению продуктов данной ферментативной реакции, либо по исчезновению субстрата. Об активности ферментов судят по скорости этих процессов. Поэтому измерение скорости ферментативных реакций является важной составной частью исследования ферментов [132, 236, 436, 441, 464].

V.1.4.1. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ

Скорость большинства ферментативных реакций, как правило, уменьшается со временем (рис. 81). Это уменьшение может быть обусловлено ингибирующим действием продуктов реакции на фермент; уменьшением концентрации субстрата по мере протекания реакции; инактивацией фермента нестабильными условиями опыта (температурой, рН и т. д.). Поэтому обычно измеряют начальные скорости ферментативных реакций, когда влияние упомянутых выше факторов минимально. Важнейшими факторами, влияющими на скорость ферментативных реакций, являются температура и концентрация водородных ионов.

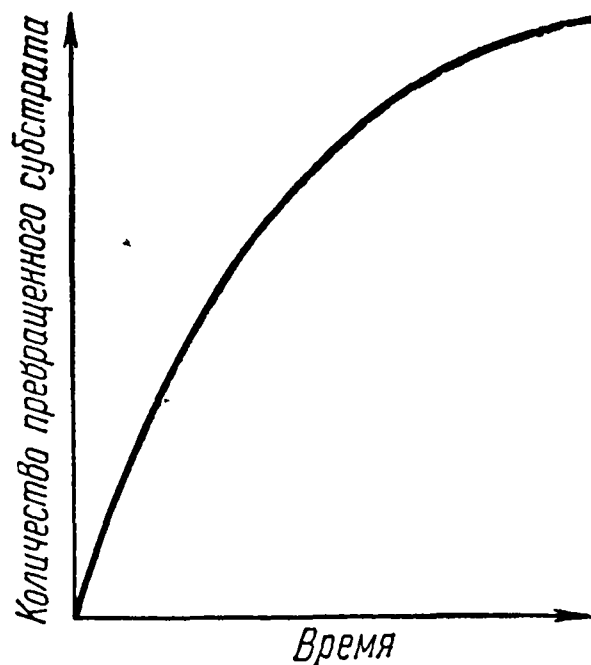


Рис. 81. Типичная кривая хода ферментативной реакции.

V.1.4.2. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

Повышение температуры в определенных пределах ускоряет ферментативные реакции, увеличивая реакционную способность реагентов, т. е. скорость превращения субстрата. Поскольку ферменты являются белками и денатурируются при нагревании выше определенной температуры, дальнейшее увеличение температуры вызывает инактивацию фермента и как следствие — уменьшение скорости катализа.

V.1.4.3. ВЛИЯНИЕ рН

Каталитические свойства ферментов тесно связаны с рН среды и в большинстве случаев максимальная активность фермента проявляется при определенном значении рН. Стабильность ферментов также зависит от рН.

Существуют оптимумы активности и стабильности рН. При значениях рН, отличающихся от оптимальных, ферменты, которые как все белковые вещества содержат заряженные радикалы, диссоциируют. Изменение заряда белка почти всегда сопровождается изменением структуры и пространственного расположения полипептидных цепей; если эти изменения затрагивают область активного центра фермента, то изменяются его каталитические свойства и соответственно скорость ферментативной реакции.

V.1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ МИХАЭЛИСА

[132, 236, 436, 441, 464]

Одной из важнейших характеристик ферментов является константа Михаэлиса. Концентрация субстрата — один из факторов, определяющих скорость ферментативной реакции. Почти во всех случаях начальная скорость ферментативной реакции непосредственно зависит от концентрации субстрата (рис. 82). Эта зависимость описывается

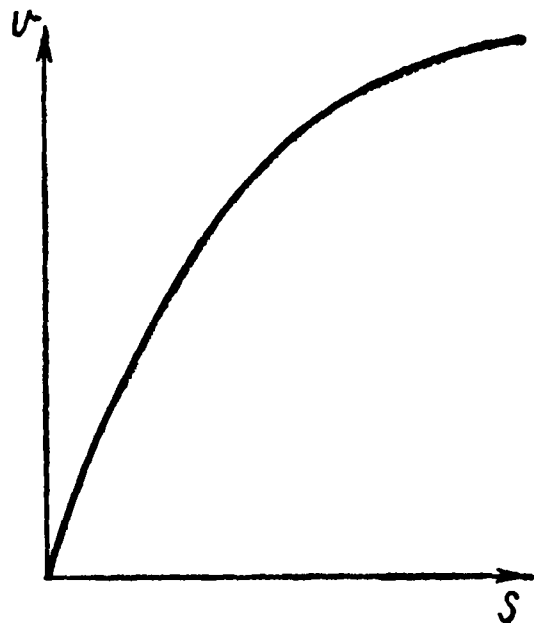


Рис. 82. Зависимость скорости (v) ферментативной реакции от концентрации субстрата (S).

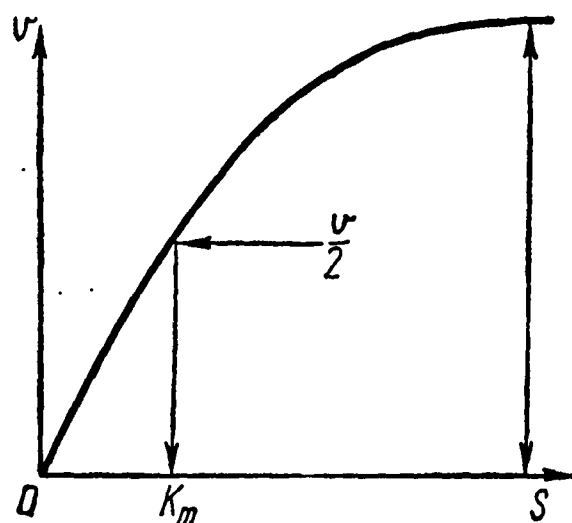
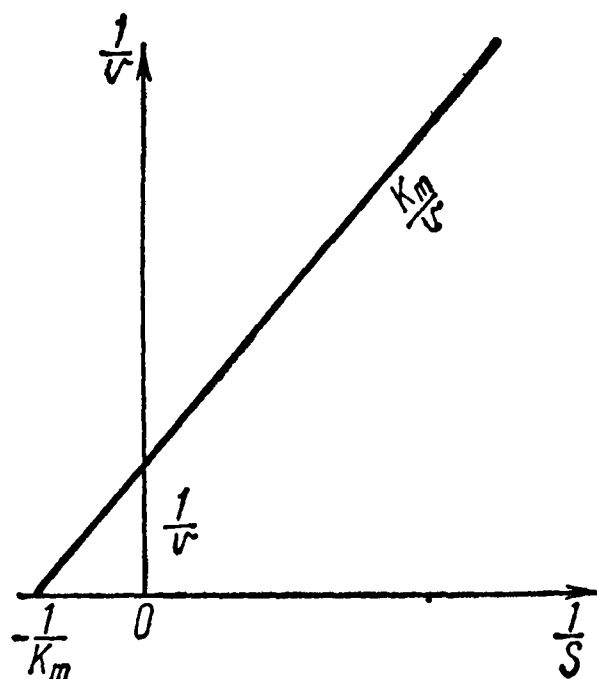


Рис. 83. Графическое определение константы Михаэлиса.

Рис. 84. Графическое определение константы Михаэлиса методом двойных обратных величин Лайнуивера — Берка.



уравнением Михаэлиса — Ментен $v = v_{\max}/(1 + K_m/S)$, где v — скорость реакции при концентрации субстрата, равной S ; $v_{\max}$ — максимальная скорость, наблюдаемая в том случае, когда концентрация субстрата достаточно высока для насыщения фермента; K_m — константа Михаэлиса для рассматриваемого фермента по отношению к данному субстрату. Имеется несколько методов графического изображения этого отношения для определения K_m . Мы остановимся только на двух.

1. График зависимости v от $[S]$ представляет отрезок гиперболы. Проекция точки $v = v/2$ кривой на абсциссу (рис. 83) соответствует значению $S = K_m$.

2. Модификация уравнения Михаэлиса — Ментен Лайнуивером и Берком основана на методе двойных обратных величин, т. е. на принципе, что если равны две какие-либо величины, то равны и обратные величины. В этом случае уравнение Михаэлиса — Ментен принимает вид (рис. 84): $K_m (1/S + 1/v_{\max})/v_{\max}$.

Откладываем по оси абсцисс значения $1/S$, а по оси ординат значение $1/v$ и строим график зависимости этих величин. Наклон полученной прямой равен величине K_m/v ; отрезок, отсекаемый прямой на оси

ординат, — это $1/v_{\max}$. Продолжая прямую за ось ординат, отсекаем на оси абсцисс отрезок, равный обратной величине константы Михаэлиса — $1/K_m$. Графические методы определения константы Михаэлиса широко применяют в ферментологии.

Константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной, и обычно выражается в молях на литр. Разные ферменты характеризуются различными значениями K_m в зависимости от начальной и максимальной скоростей реакции. При построении графиков (любым методом) для определения константы Михаэлиса определяют скорость реакции при разных значениях концентрации субстрата и устанавливают значение максимальной скорости реакции $v_{\max}$, когда увеличение концентрации субстрата уже не влияет на скорость реакции. Константу Михаэлиса следует определять за возможно более короткий промежуток времени течения ферментативной реакции, используя при этом достаточно очищенный ферментный препарат.

V.1.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

[132, 236, 333, 397, 464]

Изучение ферментативных реакций осуществляют либо путем отбора проб, либо непрерывными методами. В первом случае через определенные промежутки времени отбирают пробы и в результате измерений получают данные, по которым строят кривые хода реакции. Непрерывные методы заключаются в проведении большого числа измерений по ходу реакции или в автоматической регистрации физических и химических показателей.

Для определения ферментов применяют химические, колориметрические, газометрические, вискозиметрические, хроматографические, спектроскопические методы.

V.1.6.1. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Многие ферментативные реакции изучают отбором проб через определенные промежутки времени с последующим определением количества субстрата или продуктов гидролиза химическими методами (например, определение неорганического фосфора по Фiske и Суббароу). По приросту или убыли неорганического фосфора определяют активность фосфатазы и фосфорилазы; по редуцирующей способности с помощью реакции восстановления меди определяют активность ферментов, действующих на ди- и полисахариды. Для изучения протеолитических ферментов широко используют методы формольного титрования и титрование спиртовой щелочью — метод Вильштеттера. Действие липаз определяют по количеству образовавшихся жирных кислот в результате гидролиза сложных эфиров.

V.1.6.2. ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ [177]

Применение этого метода основано на определении изменения удельного вращения раствора по мере протекания реакции, так как многие ферменты действуют только на один из оптических изомеров. Если, например, продукт реакции оптически не активен, а субстрат активен, то ход реакции можно проследить по изменению оптического вращения растворов. С аналогичным положением мы сталкиваемся в том случае,

когда субстрат оптически неактивен, но в ходе реакции образуется оптически активный продукт или же когда субстрат и продукты реакции оптически активны, но значительно отличаются по величине удельного вращения.

V.1.6.3. ГАЗОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Большая группа методов определения активности ферментов основана на количественном учете образующихся в результате реакции газообразных продуктов. Эти методы удобны для определения оксидаз (поглощение O_2) или декарбоксилаз (выделение CO_2), гидрогеназ, уреаз или карбоангидраз, а также аминок групп, освобождающихся при ферментативном расщеплении белков и пептидов — метод Ван-Сляйка (основан на манометрическом определении газообразного O_2 , выделяющегося под действием H_2O_2).

Манометрические методы применяют для определения интенсивности дыхания тканей, мицелия грибов или бактериальных клеток и количественного исследования ферментативных реакций, сопровождающихся выделением или поглощением газа.

V.1.6.4. ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Основаны на изменении вязкости растворов. Применяются главным образом для изучения ферментов, действующих на крупные макромолекулы, например белки, пектины, НК, клетчатку, и другие, т. е. на вещества, при растворении которых образуются растворы, отличающиеся по вязкости от исходных (см. разделы V.4.3. и V.9.4).

V.1.6.5. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Хроматографические методы с успехом применяют для определения целлюлаз (по составу сахаров, образующихся в результате расщепления целлюлозы), протеолитических ферментов (определение степени расщепления белкового субстрата по составу аминокислот, ди- и полипептидов), декарбоксилаз аминокислот и других ферментов, под действием которых образуются вещества, требующие точной идентификации (см. разделы V.4; V.5; VI.1).

V.1.6.6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Эти методы основаны на разной способности субстратов и продуктов ферментативных реакций поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой областях спектра. Определяя изменения поглощения света реакционной смесью, можно количественно оценить течение ферментативной реакции. При проведении сравнительных исследований изменения скорости реакции определяют по изменению оптической плотности, а единицы активности фермента выражают в единицах оптической плотности.

Спектрофотометрический метод применяют также для изучения действия окислительных ферментов: 1) цитохромов (полосы поглощения восстановленных форм цитохромов отличны от полос поглощения окисленных); 2) дегидрогеназ в сочетании с коферментами НАД⁺ и НАДФ⁺ (окисленные и восстановленные формы этих соединений резко различаются по своим спектрам); 3) протеаз (по определенному количеству тирозина и триптофана, образующегося при расщеплении белка) (см. раздел V.9.3).

V.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ

V.2.1. НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ [132, 236, 464]

Ферменты — относительно неустойчивые вещества. При неблагоприятных условиях они легко денатурируются и инактивируются. Успех работы с ферментами зависит от соблюдения ряда условий, основными из которых являются поддержание щадящей температуры и умеренной концентрации водородных ионов. Выделение многих ферментов осуществляют при температуре около 0° С и нейтральном значении рН, так как большинство ферментов инактивируется в растворах с рН ниже 5 или выше 9, хотя из этого правила имеются исключения. При доведении рН раствора фермента до определенного значения реагент следует добавлять медленно, давая ему стекать по стенке сосуда, одновременно энергично перемешивая раствор. Добавлять реагент следует, если это возможно, при 0° С. Многие ферменты денатурируются на границе раздела фаз. Поэтому важно избегать образования пены — переливать раствор фермента из одного сосуда в другой следует по стенке сосуда. По этой же причине не следует употреблять мешалки, вспенивающие жидкость. Желательно пользоваться магнитными мешалками.

При фракционировании сульфатом аммония, если соль добавляют в сухом виде, растворенный в жидкости воздух может «высаливаться» в виде мелких пузырьков, вызывая денатурацию ферментов. Устранить это явление можно, добавляя соль в виде насыщенного раствора.

Органические растворители (например, достаточно концентрированные спирты, ацетон) инактивируют большинство ферментов при комнатной температуре. Поэтому фракционное осаждение спиртом или ацетоном необходимо проводить при возможно более низкой температуре, следя за тем, чтобы раствор не нагревался в результате выделения тепла при смешивании растворителя с водой.

Выпавшие осадки отделяют фильтрованием или центрифугированием. Последнему способу обычно отдают предпочтение при наличии центрифуги с охлаждением.

Во многих случаях фермент при выделении и очистке медленно инактивируется даже в наиболее благоприятных условиях. Поэтому целесообразно очищать ферменты по возможности быстро, заканчивая выделение в течение 2—3 дней. Для предотвращения инактивации ферментов при хранении их содержат в состоянии глубокого охлаждения (если замораживание и оттаивание не влияют на активность). При этом ферменты остаются стабильными в течение многих месяцев. Высушивание ферментов в условиях высокого вакуума при низкой температуре — лиофильная сушка — весьма ценный метод, с помощью которого можно получить активный растворимый препарат, сохраняющий свои свойства при комнатной температуре.

V.2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ [4, 96, 385, 399]

Универсального метода выделения и очистки ферментов не существует, однако существуют общие правила, соблюдение которых обязательно. Приступая к работе по очистке ферментов, в первую очередь необходимо выбрать количественный тест определения ферментативной активности. Поскольку при выделении фермента большая часть времени уходит на определение его активности в различных фракциях,

в данном случае скорость определений более важна, чем точность. Например, в процессе фракционирования и очистки метод определения активности, требующий 5 мин и допускающий ошибку 10—20%, предпочитают более точному методу, требующему 30 мин.

После того как подобраны организмы — продуценты определенного фермента и оптимальные условия (состав среды, рН, время и способ культивирования — поверхностное или погруженное и т. д.), можно приступать к получению ферментного препарата. Если фермент выделяется в культуральную жидкость, его осаждают, если находится внутри клетки, его экстрагируют. Для разрушения грибных клеток используют различные способы в зависимости от их прочности: растирание мицелия с измельченным стеклом или песком; растирание с окисью алюминия (1 : 1); замораживание — оттаивание; разрушение ультразвуком; обработку растворителями (например, ацетоном).

V.2.3. ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ [105, 106, 399]

В экстрактах помимо ферментов присутствуют вещества разной молекулярной массы. Мелкие молекулы удаляют диализом, гель-фильтрацией на сефадексах g-15, g-25 либо ультрафильтрацией [105, 106, 142, 333, 385]. После этого в растворе остаются крупные молекулы, преимущественно белки.

Удаление балластных белков и других веществ можно осуществлять изменением рН среды и нагреванием. При изменении рН среды, особенно в кислую сторону, происходит кислотная денатурация белков и выпадение их в осадок. Этим приемом надо пользоваться с осторожностью, так как возможна частичная денатурация выделяемого фермента.

В случаях, когда получаемый фермент достаточно термостабилен, применяют метод фракционной денатурации нагреванием. Если раствор прогревать в течение короткого времени при температуре ниже той, которая вызывает денатурацию выделяемого белка, то значительная часть балластных белков денатурируется и выпадает в осадок. При применении специфических стабилизирующих веществ (например, субстратов, ионов Ca^{2+}) температуру можно повысить на 7—10° выше температуры, при которой происходит денатурация фермента без стабилизации.

Для удаления небелковых веществ, если они содержатся в ферментной системе в виде случайных примесей, применяют разнообразные методы: липиды удаляют экстракцией растворов ферментов органическими растворителями; полисахариды — обычно обработкой амилитическими ферментами (без примесей протеаз); НК — осаждением основным белком (например, протамином), однако обработка нуклеазами более эффективна.

После проведения предварительных этапов дальнейшее выделение и очистка ферментов заключаются в осаждении белка разными методами и его фракционировании. Фракционирование всегда сопровождается контрольными определениями активности фермента, при этом особое внимание уделяют рН и концентрации электролита, влияние которых на активность ферментов велико. Для фракционирования в настоящее время пользуются относительно небольшим количеством стандартных способов, которые описаны ниже.

V.2.3.1. ФРАКЦИОННОЕ ОСАЖДЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Один из основных методов очистки белка. Вследствие инактивации органическими растворителями большинства ферментов этот метод требует поддержания во время работы низкой температуры. В качестве органических растворителей используют ацетон, метиловый, изопропиловый, этиловый спирты. Дать конкретные рекомендации по применению тех или иных реагентов затруднительно, так как для каждого фермента применение того или иного растворителя и его концентрация определяются экспериментально.

V.2.3.2. ФРАКЦИОННОЕ ОСАЖДЕНИЕ СОЛЯМИ

Широко применяемый метод. Особенно часто используют химически чистый сульфат аммония благодаря его высокой растворимости в воде и стабилизирующему действию на ферменты. При описании методов выделения ферментов количество сульфата аммония обычно

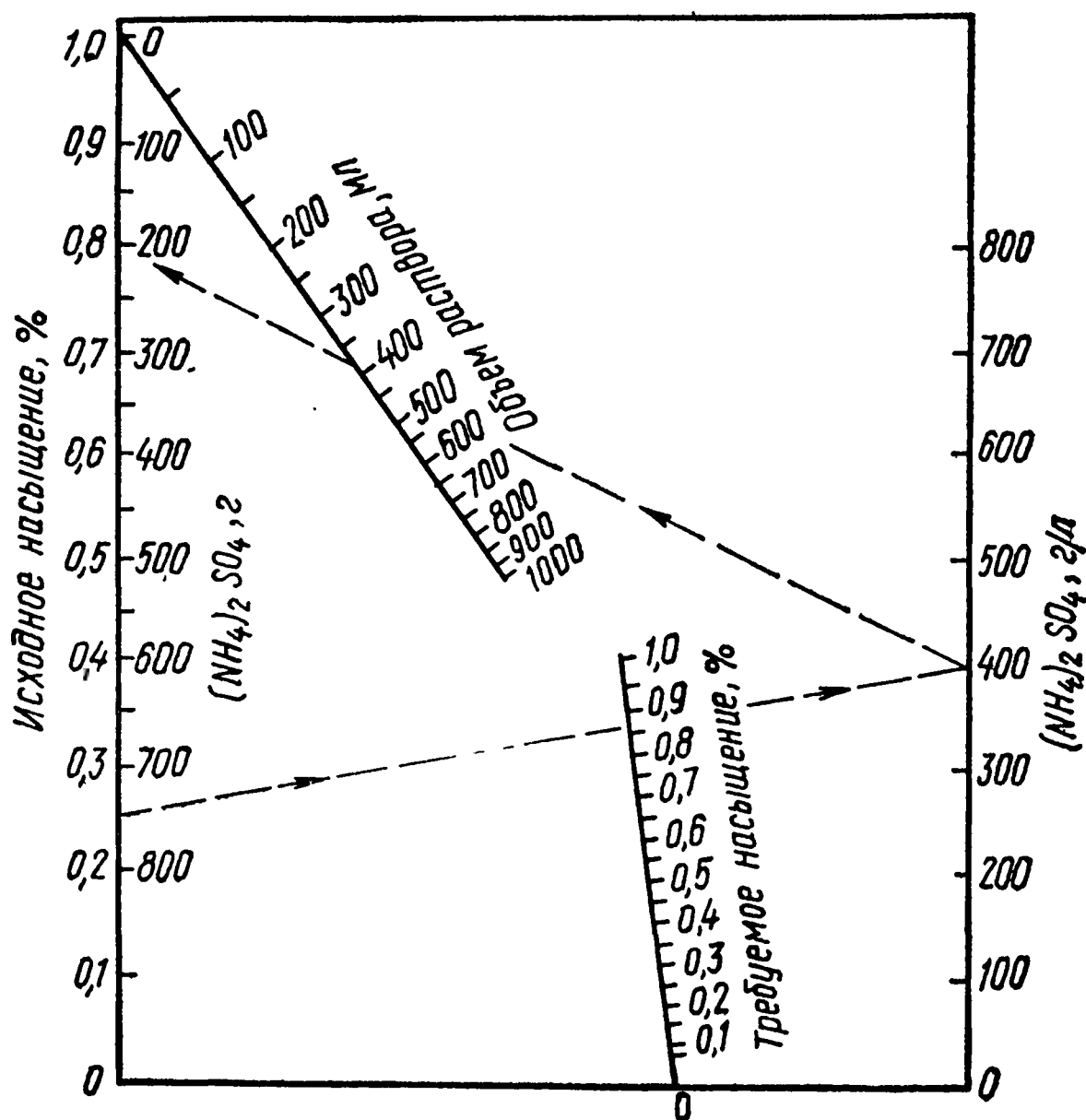


Рис. 85. Номограмма для вычисления количества сульфата аммония, которое должно быть добавлено для получения заданного процента насыщения.

выражают в процентах насыщения (например, фракция, осаждаемая при 50% насыщения) (рис. 85). При фракционировании солями необходимо работать с одной порцией ферментного раствора, постепенно удаляя каждую предыдущую фракцию до осаждения последующей и каждый раз увеличивая процент насыщения сульфатом аммония.

V.2.3.3. АДСОРБЦИЯ

Возможны два пути адсорбции: 1) адсорбция фермента (если он адсорбируется) с его последующей экстракцией или элюцией с адсорбента; 2) адсорбция балластных веществ из ферментного раствора (если фермент не адсорбируется).

В настоящее время в качестве адсорбента белков используют главным образом гели фосфата кальция и гидроокиси алюминия, каолин, силикагель, крахмал, целлюлозу; для адсорбции нежелательных примесей и пигментов — древесный уголь. Лучше всего адсорбция происходит в слабокислых растворах при рН 5 — 6 и при нужной концентрации электролита. Ферменты элюируют с адсорбента слабощелочными растворами буферов. Объем элюирующей жидкости не должен превышать объема отцентрифугированного геля. Рекомендуются многократная элюция небольшими порциями элюата.

V.2.3.4. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В последнее время широкое применение нашли методы очистки ферментов на ионообменных смолах (ультрафильтрация) и фракционирование смесей, содержащих белки, фильтрованием через гели «Сефадекс». Современные хроматографические методы позволяют быстро выделить относительно чистые белковые фракции из небольшого количества сложной смеси (подробное описание метода хроматографии белков на ионообменных смолах см. в разделе VII. 2., а также в работах [105, 106, 142, 399]).

V.2.3.5. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ [219, 421, 725]

Метод основан на специфическом взаимодействии ферментов с субстратом (или аналогом субстрата), связанным с нерастворимым носителем (например, агарозой, целлюлозой). Суть его заключается в том, что через колонку, заполненную специфическим сорбентом, пропускают раствор, содержащий выделяемый фермент. Последний связывается с лигандом, а посторонние вещества, в том числе и белки, свободно выходят из колонки. Затем в соответствующих условиях адсорбированный фермент элюируют с колонки. Таким образом получают довольно высокоочищенные ферменты. В качестве примера можно привести фракционирование протосубтилина на ДИФ-гексаметилендиаминсефарозе 4В и грамицидин-С-сефарозе 4В; протеаз животного и микробного происхождения на тозилтриэтилентетрааминсефарозе и карбобен-заокситриэтилентетрааминсефарозе [148, 219].

V.2.3.6. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ [284, 424, 569]

Один из перспективных методов очистки ферментов, основанный на том, что в изоэлектрической точке (ИЭТ) суммарный заряд белковой частицы равен нулю и она не движется в электрическом поле. Для проведения изоэлектрического фокусирования колонку наполняют смесью амфолинов с различными ИЭТ (рН 3—10). Под действием электрического поля амфолины распределяются в колонке соответственно их ИЭТ. В результате образуется градиент рН. Ферменты, находящиеся в растворе вместе с амфолином, также разделяются под действием электрического поля, занимая в градиенте рН положение, соответ-

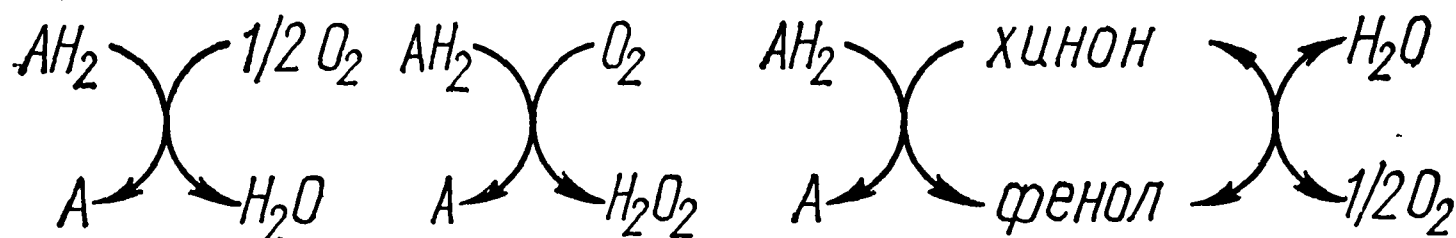
вующее их ИЭТ. Изоэлектрофокусирование целесообразно проводить в градиенте плотности сахарозы и при температуре 0° С. Оптимальный вариант чередования приемов фракционирования и очистки определяют экспериментально для каждого фермента.

У.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ, КАТАЛАЗЫ, ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

У.3.1. ФЕРМЕНТЫ — АКТИВАТОРЫ КИСЛОРОДА. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Согласно классификации и номенклатуре ферментов, рекомендованных Международным биохимическим союзом по номенклатуре и классификации ферментов в 1961 г., ферменты этой группы, как и все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, относятся к классу оксидоредуктаз. Придерживаясь в основном международной номенклатуры, мы выделяем группу активаторов кислорода, как это делают Б. А. Рубин, М. Е. Ладыгина [391], поскольку оксидазы грибов наиболее близки к растительным.

Функция ферментов данной группы состоит в активировании молекулярного кислорода



Группа активаторов кислорода, также как и ферментов, активирующих водород, многочисленна. В зависимости от природы металла, входящего в состав простетических групп, оксидазы можно разделить на две подгруппы: железопротеиды (Fe-протеиды) и медьпротеиды (Cu-протеиды). Fe-протеиды — двухкомпонентные каталитические соединения, простетической группой которых являются Fe-порфирины. Fe-протеиды, соединяясь с кислородом, образуют окислы: $x\text{Fe} + \text{O}_2 = x\text{FeO}_2$, которые передают свой кислород дыхательному субстрату: $2\text{A} + x\text{FeO}_2 \rightarrow 2\text{AO} + x\text{Fe}$. Восстановленное железо вновь способно служить акцептором кислорода.

Наиболее активной в группе Fe-протеидов является система цитохромов. К этой же группе обычно относят каталазу и пероксидазу, которые по ряду свойств близки к оксидазам, хотя используют для окисления субстратов кислород перекисей. Представителями Cu-протеидов являются фенолоксидазы и аскорбинатоксидаза.

Наряду с «классическими» оксидазами, которые используют молекулярный кислород как акцептор электронов, существуют ферменты, активирующие молекулярный кислород, т. е. катализирующие внедрение кислорода в молекулу дыхательного субстрата. Эти ферменты принято называть оксигеназами, или трансферазами кислорода, поскольку они переносят кислород непосредственно на субстрат. К этой группе ферментов относят липоксигеназу, пирокатехазаы, оксигеназы триптофана и др.

Наконец, к терминальным оксидазам относят группу ферментов, которые катализируют перенос водорода (электронов) дыхательного

субстрата непосредственно на молекулярный кислород. Эти ферменты называют аэробными дегидрогеназами и подразделяют на содержащие металл — ксантиногеназы, нитратредуктазы и не содержащие металл — ксилозооксидазы, глюкозооксидазу и оксидазы аминокислот.

Пероксидаза катализирует окисление субстрата перекисью водорода. Считают, что она разлагает перекись водорода с освобождением атомарного кислорода, который и используется на окисление различных соединений. Наиболее полно изучены широко распространенные пероксидазы растений. Среди грибов образование пероксидазы обычно присуще дереворазрушающим базидиомицетам [680], а также микромицетам, особенно выделенным из лесной подстилки [356]. Образование пероксидазы у грибов зависит от экологических условий.

Сущность каталитического действия *каталазы* состоит в разложении перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода. У грибов каталаза встречается чаще, чем пероксидаза [356].

Фенолоксидазы мало специфичны, они катализируют в присутствии молекулярного кислорода окисление не только разнообразных полифенолов и их производных, но и ряда монофенолов с образованием соответствующих хинонов. К фенолоксидазам относятся *p*-дифенолоксидаза (лакказа) и *o*-дифенолоксидаза (тирозиназа). Образование фенолоксидаз установлено для большого ряда дереворазрушающих базидиомицетов [682].

Глюкозооксидаза осуществляет прямое окисление *D*-глюкозы молекулярным кислородом с образованием глюконовой кислоты как конечного продукта. Она широко распространена среди микромицетов.

У.3.2. ОКСИДАЗНЫЕ ТЕСТЫ

Для определения способности грибов выделять в среду окислительные ферменты существует несколько методов, основанных на цветных реакциях. Эти методы разработаны для выявления оксидазной активности дереворазрушающих базидиомицетов, однако могут быть использованы и для других грибов.

Метод Бавендамма [510] — метод разделения грибов на целлюлозоразрушающие и лигнинразрушающие. К агар-солодовой среде добавляют 0,2—0,5% танина или галловой кислоты. О выделении фенолоксидаз судят на основании появления коричневой окраски в субстрате вблизи растущего мицелия. Рекомендуют использовать более низкие концентрации танина (0,08—0,1%), так как в больших концентрациях он может тормозить рост гриба и влиять непосредственно на выделение ферментов. Считают, что танин и галловая кислота дают различный эффект и их нельзя считать физиологически равноценными тестами [681].

Метод Йоргенсена — Вайбли основан на окислении антоцианов, изменяющих красный или синий цвет на желтый под действием фенолоксидаз. Рекомендуют также смесь диэтиленпарафенилендиамина с α -нафтолом или метолом. Эту реакцию можно использовать и для количественного определения фенолоксидаз [640, 801].

Реакцией Бавендамма обнаруживают не менее трех ферментов: *p*-дифенолоксидазу, пероксидазу и *o*-дифенолоксидазу. Комплексную реакцию Бавендамма можно заменить другими цветными реакциями (табл. 11).

Ниже приведены методы определения активности пероксидазы, каталазы и глюкозооксидазы.

Т а б л и ц а 11. Субстратная специфичность лакказы, пероксидазы и тирозиназы [681]

Субстрат	Способ применения	Реакция на		
		лакказу	пероксидазу (H ₂ O ₂)	тирозиназу
α-Нафтол 0,005 %-ный	Субстрат до- бавляют в агар- солодовую сре- ду	+ Синяя	+ Синяя	0
Гваякол 0,005 %-ный		+ Красно- вато-ко- ричневая 0	+ Красно- вато-ко- ричневая 0	0
Тирозин 0,2 %-ный	То же			+ Красно- вато-ко- ричневая
Танин 0,1 %- ный	» »	+ Коричне- вая	+ Коричне- вая	+ Коричне- вая
n-Крезол 10 ⁻² М с 0,02 %-ным гликолом	Заливают рас- твором куль- туру гриба на агар-солодовой среде	+ Белая	+ Белая	+ Красная
Бензидин 0,1 %-ный в уксуснокис- лом буфере с рН 4,4	То же	+ Синяя	+ Синяя	0

У.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ

Первичный отбор грибов, образующих пероксидазу, проводят на специфических субстратах их культивирования [355, 356]. Метод основан на определении интенсивности окраски продукта окисления о-дианизидина перекисью водорода, образованного при действии пероксидазы. Единица пероксидазы соответствует количеству фермента, катализирующему превращение 1 мкмольа Н₂О₂ за 1 мин в оптимальных условиях [125].

Приборы, посуда: мерные пипетки на 1, 2,5 и 10 мл, фотоэлектроколориметр, секундомер, термометр химический и химические пробирки на 10 мл.

Реактивы: 1) о-дианизидиновый реактив: 50 мл 0,4 М фосфатного буфера, рН 5,9; 2 мл 1 %-ного спиртового раствора о-дианизидина и дистиллированной воды до 200 мл (реактив хранят до 2 нед в посуде из темного стекла на холоду); 2) 0,05 %-ный свежеприготовленный раствор перекиси водорода; 3) раствор фермента (культуральная жидкость или раствор препарата); 4) 50 %-ный раствор серной кислоты.

Последовательность определения. В пробирки на 10 мл приливают 0,1—0,5 мл раствора пероксидазы, 3 мл о-дианизидинового реактива, воды до объема 4,8 мл и 0,2 мл 0,05 %-ного Н₂О₂. Предварительно все растворы должны быть нагреты до 20° С. В последнюю очередь добавляют Н₂О₂ и пробирки погружают в водяную баню (20° С). Инкубируют 5 мин. Реакцию приостанавливают прибавлением 50 %-ной серной

кислоты до объема 10 мл. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе с зеленым фильтром в 10-миллиметровой кювете против стандарта, который содержит все ингредиенты, добавляемые в такой последовательности: вода, серная кислота, фермент, H_2O_2 . Активность определяют по значению коэффициента микромолярной экстинкции, равного 0,0128. Количество превращений H_2O_2 за 5 мин: $C = (\text{экстинкция}/0,0128) \times \text{разведение}$. Если инкубационная смесь содержала 0,1 мл культуральной жидкости, экстинкция равна 0,20, то активность пероксидазы в расчете на 1 мл культуральной жидкости будет равна $0,20 \cdot 10 \cdot 1/0,0128 \cdot 1000 \times \times 0,1 \cdot 5 = 0,312$ единицы, где 0,20 — экстинкция; 10 — объем окрашенной пробы (мл); 1000 — коэффициент для пересчета из миллилитров в литры; 0,0128 — коэффициент микромолярной экстинкции; 0,1 — объем раствора пероксидазы (мл); 5 — время инкубации (мин). Или, если, например, инкубационная смесь содержала 0,2 мл раствора фермента (2 мкг), интенсивность окраски была такая же (0,20), то количество единиц активности пероксидазы в 1 мл препарата равно $0,20 \cdot 10 \times \times 1000/0,0128 \cdot 1000 \cdot 2 \cdot 5 = 15,6$.

У.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

Метод основан на титрометрическом определении количества разложившейся перекиси водорода в течение определенного времени [254, 397]. За единицу активности каталазы принято количество фермента, катализирующее разложение 1 мкМ H_2O_2 (0,034 мг) за 1 мин.

Посуда: колбочки емкостью 50 мл, пипетки, градуированные на 1, 2 и 3 мл; мерный цилиндр емкостью 1 л; микробюретка на 5 мл.

Реактивы: 0,01 н. раствор перекиси водорода в 0,006 М фосфатном буфере, рН 6,8; 5 н. раствор серной кислоты; 10%-ный раствор йодистого калия; 1%-ный раствор молибдата аммония; 1%-ный раствор крахмала; 0,01 н. раствор тиосульфата натрия.

Последовательность определения. В колбочки емкостью 50 мл наливают по 5 мл раствора перекиси водорода в фосфатном буфере и прибавляют по 0,5 мл разведенной до нужной концентрации культуральной жидкости. Инкубируют 3 мин на льду и затем реакцию останавливают добавлением 2 мл 5 н. раствора серной кислоты. Далее в колбочки приливают по 2 мл 10%-ного раствора йодистого калия и по 1—2 капли 1%-ного раствора молибденовокислого аммония. Через 3 мин оттитровывают выделившийся йод 0,01 н. раствором тиосульфата натрия.

В конце титрования для четкого фиксирования конечной точки процесса добавляют в качестве индикатора 1—2 капли 1%-ного раствора крахмала. Контролем служит проба, в которую вместо культуральной жидкости приливают дистиллированную воду.

Исходя из того что 1 мл 0,01 н. тиосульфата натрия соответствует 0,17 мг перекиси водорода и зная разницу между его количеством, ушедшим на титрование контрольной и опытной проб, количество разложенной перекиси водорода рассчитывают по формуле $X = (V_k - V_{оп}) \times \times 0,17/0,5 \cdot 0,034 \cdot 3 = (V_k - V_{оп}) 3,33 P$, где X — активность каталазы в 1 мл исходного раствора; V_k — количество тиосульфата натрия, ушедшего на титрование контрольной пробы (мл); $V_{оп}$ — количество тиосульфата натрия, ушедшего на титрование опытной пробы (мл); 0,17 — количество H_2O_2 (мг), соответствующее 1 мл 0,01 н. тиосульфата натрия; 0,034 — количество H_2O_2 (мг), соответствующее 1 мкМ; 0,5 — количество разведенной культуральной жидкости в пробе; 3 — время инкубации (мин); P — фактор разведения.

Для точности анализа разность $V_k - V_{оп}$ не должна быть меньше 1,1 и выше 2,3 мл. В первом случае в анализ берут большее количество ферментного раствора, во втором — его разводят.

V.3.5. ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Метод основан на титрометрическом определении активности глюкозооксидазы по количеству перекиси водорода, образующейся в процессе окисления глюкозы глюкозооксидазой [130, 254]. Активность фермента выражается в международных манометрических единицах. За единицу глюкозооксидазной активности принято количество фермента, катализирующее окисление 1 мкМ глюкозы за 1 мин в оптимальных условиях: температуре 30° С, избытке кислорода и глюкозы, что сопровождается потреблением 1 мкМ кислорода, равного 22,4 мкг.

Посуда, приборы: колбочки емкостью 50 мл; пипетки, градуированные на 1 и 5 мл; мерные колбочки емкостью 50 мл; микробюретка на 2—5 мл; аппарат для встряхивания.

Реактивы: ацетатный буфер с рН 5,8 (в мерную колбочку емкостью 50 мл вливают 19,5 мл 0,25 М уксуснокислого натрия, 0,5 мл 0,25 М уксусной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают); 33%-ный раствор глюкозы; 10%-ный раствор йодистого калия; 0,01 н. раствор тиосульфата натрия; 20%-ный раствор серной кислоты; 1%-ный раствор молибденовокислого аммония; 1%-ный раствор крахмала.

Последовательность определения. В колбочки емкостью 50 мл вливают по 4,5 мл 0,1 М ацетатного буфера с рН 5,8 и 0,5 мл соответствующим образом разведенной культуральной жидкости. Колбочки устанавливают на аппарат для встряхивания, быстро добавляют по 0,5 мл 33%-ного раствора глюкозы и встряхивают 10 мин. Через 10 мин аппарат выключают и реакцию прекращают прибавлением к смеси 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты. Контролем служит аналогичная смесь, в которую реактивы прибавляют в обратном порядке: серную кислоту, затем раствор фермента, буфер и глюкозу. Далее в каждую из колб (контрольную и опытную) добавляют по 1 мл 10%-ного раствора свежеприготовленного йодистого калия и по одной капле 1%-ного раствора молибденовокислого аммония (катализатор). Через 3 мин йод, образовавшийся вследствие реакции между йодистым калием и перекисью водорода, оттитровывают 0,01 н. раствором тиосульфата натрия (по индикатору — крахмалу). По разности объемов, затраченных на титрование контрольной и опытной проб, судят о количестве фермента. Активность фермента определяют измерением количества перекиси водорода, образовавшейся в ходе реакции при 20° С на воздухе. Метод калиброван к манометрическому. Определен коэффициент пересчета. Активность фермента рассчитывают по формулам.

1. Подсчет активности в единицах (Е) в 1 мл раствора: $X = VK 0,17 \times \times P 2,3/10 \cdot 0,034$, где V — количество 0,01 н. тиосульфата натрия, затраченного на титрование пробы (мл); K — поправочный коэффициент к титру тиосульфата натрия; 0,17 — количество H_2O_2 (мг), соответствующее расходу 1 мл 0,1 н. тиосульфата натрия; P — фактор разведения; 0,034 — количество H_2O_2 (мг) в 1 мкМ; 10 — время инкубации (мин); 2,3 — коэффициент пересчета, выведенный экспериментально для перевода полученных величин в манометрические единицы.

2. Подсчет активности в единицах (Е) в 1 г препарата: $X_1 = VK \cdot 0,17 \cdot 1000 \cdot 2,3/10 \cdot 0,034n$, где n — количество препарата в инкубационной смеси (мг); 1000 — коэффициент для пересчета из миллиграммов в граммы.

3. Для выражения активности глюкозооксидазы по количеству поглощенного кислорода Q_{O_2} : $X_2 = VK \cdot 0,17 \cdot 22,4 \cdot 60 \cdot 2,3/10 \cdot 0,034n$, где 22,4 — количество O_2 (мкМ), соответствующее 1 мкг; 60 — коэффициент для пересчета из часов в минуты.

В ферментных растворах, содержащих каталазу, ее необходимо инактивировать до определения глюкозооксидазной активности. Для этого к 4,5 мл испытуемого комплексного ферментного раствора, содержащего не более 50 ед./мл каталазы, прибавляют 0,5 мл 1 н. раствора муравьиной кислоты и определяют активность глюкозооксидазы описанным выше методом. Данные анализа увеличивают в 1,11 раза. Работая с комплексным раствором, заранее определяют активность каталазы описанным выше методом.

У.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦЕЛЛЮЛАЗ

У.4.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Целлюлоза — одно из наиболее распространенных в природе органических соединений, составляющее основу оболочек растительных клеток. Вопросы разложения целлюлозы ферментами микробного происхождения приобрели в последнее время большое практическое и теоретическое значение.

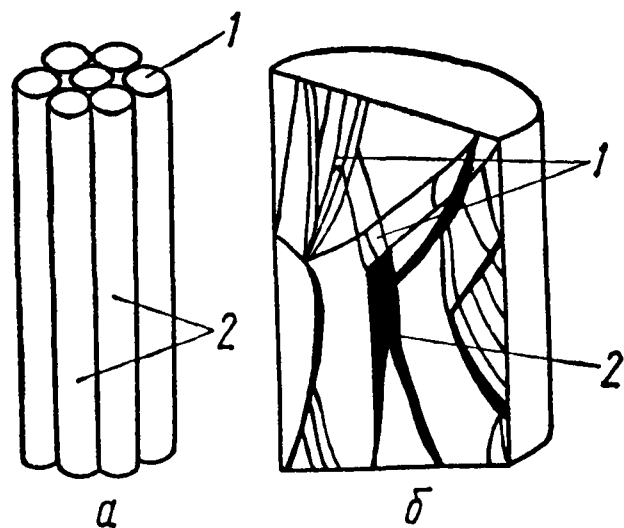


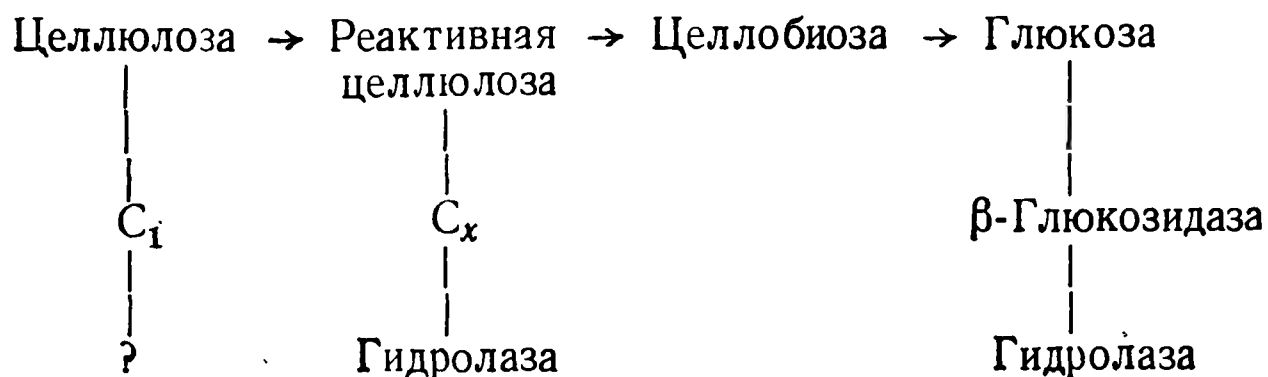
Рис. 86. Строение волокна целлюлозы: схематическое изображение макро- (а) и микроструктуры (б) волокна: а: 1 — межфибрилярное пространство; 2 — микрофибриллы; б: 1 — «аморфные» районы; 2 — «кристаллические» районы.

β-1,4-глюканаза (К.Ф.3.2.1); эндо-β-1,4-глюканаза (К.Ф.3.2.1.4) и β-глюкозидаза (К.Ф.3.2.1.21). Между экзо- и эндоглюканазами, гидролизующими кристаллическую целлюлозу («Avicel») и не гидролизующими набухшую в кислоте целлюлозу, отмечен синергизм [579]. β-Глюкозидазы гидролизуют целлобиозу и короткие цепочки целлоолигосахаридов до глюкозы и не оказывают влияния на целлюлозу [650].

Согласно современным представлениям молекула целлюлозы представляет собой полимерную цепь, состоящую из остатков молекулы 1,4-β-D-глюкопиранозы, или целлобиозы. Молекулы целлюлозы, имеющие нитевидную форму, соединены водородными связями в пучки — мицеллы, или микрофибриллы, каждая из которых состоит приблизительно из 60 молекул (рис. 86, 87). Такое строение целлюлозы придает ей характерные механические свойства и в определенной степени обуславливает особенности ее ферментативного гидролиза [57, 237, 579].

Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется комплексом ферментов. Установлено, что существует по крайней мере три различных типа целлюлозолитической активности: экзо-

В настоящее время принято считать, что гидролиз целлюлозы происходит по схеме, впервые предложенной Е. Т. Рииз и сотр. [749, 750]:



Установлено присутствие негидролитического фермента C₁, инициирующего гидролиз нативной целлюлозы путем разрушения водородных

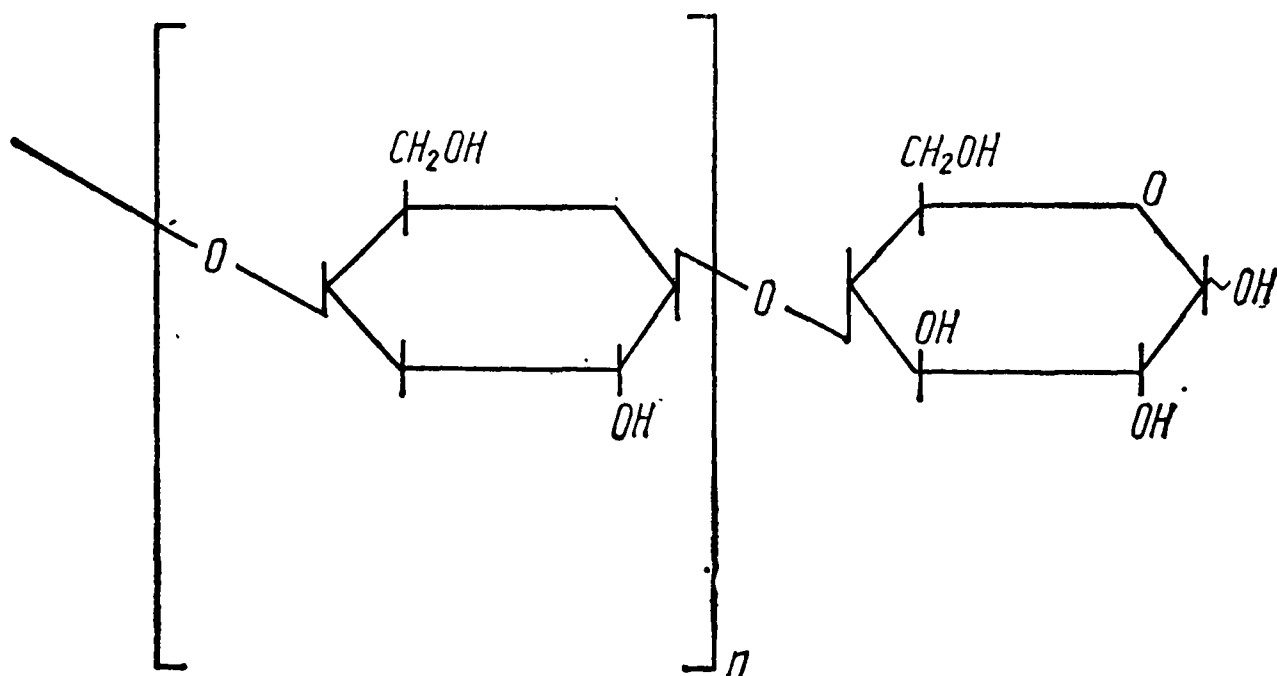


Рис. 87. Фрагмент полимерной цепи молекулы целлюлозы.

связей между целлюлозными цепочками, которая становится доступной для действия гидролитических ферментов C_x [689, 690]. Показано также, что микроорганизмы, которые не синтезируют C₁-фермент, не растут на нативной целлюлозе. Считают, что C₁-фермент является экзо-β-1,4-глюканазой, а комплексное действие эндо- и экзоглюканаз обеспечивает гидролиз целлюлозы до растворимых целлоолигосахаридов, главным образом целлобиозы, которая освобождается экзоглюканазами [579, 684, 688—690, 718]. Целлюлозолитические ферменты различают также по характеру действия на субстрат. Экзоглюканаза (C₁-фермент) отщепляет целлобиозу от нередуцированного конца целлюлозной цепи; ее относят к β-1,4-глюканцеллобиогидролазам (К.Ф.3.2.1) [579]. Таким образом, экзо-β-глюканаза является первым ферментом, который принимает участие в гидролизе нативной целлюлозы. Хлопковое волокно является лучшим субстратом [690, 718], однако вполне пригодна также микрокристаллическая целлюлоза, которая гидролизруется только экзо-β-глюканазой. Поскольку при действии фермента на субстрат образуется целлобиоза как продукт реакции, на определение редуцирующих сахаров влияет присутствие β-глюкозидазы. Поэтому для определения истинной активности экзо-β-глюканазы следует вычесть активность редуцирующих сахаров, образованных при гидролизе микрокристаллической целлюлозы или хлопкового волокна (при отсутствии других целлюлозолитических ферментов), из общей активности.

Эндоглюканы гидролизуют β -1,4-глюканы неупорядоченно; их относят к β -1,4-глюканглюканогидролазам (К.Ф.3.2.1.4.). Эндоглюканы можно дифференцировать по неупорядоченному воздействию на карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) и скорости солубилизации целлюлозы, набухающей в фосфорной кислоте [579]. Лучшим субстратом для определения эндо- β -глюканазной активности (S_x -ферментов) является растворимое производное целлюлозы типа КМЦ, так как на нее не воздействуют другие целлюлозолитические ферменты, кроме эндо- β -глюканы [579].

В настоящее время только экзо- β -1,4-глюканаза получена в очищенном виде и дана ее физико-химическая характеристика. Все известные организмы, гидролизующие нативную целлюлозу, способны образовывать по крайней мере одну экзо- β -глюканазу. В случае *Trichoderma viride*, *T. koningii* этот фермент является β -1,4-глюканцеллобиогидролазой [579, 585].

β -Глюкозидаза, или целлобиаза (К.Ф.3.2.1.21), гидролизует главным образом целлобиозу и высшие целлодекстрины до глюкозы. Этот фермент ускоряет гидролиз целлюлозы, удаляя целлобиозу, которая является ингибитором экзо- β -глюканы.

При изучении целлюлозолитических свойств грибов их выращивают на минеральной среде Чапека с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода. Полоски фильтровальной бумаги размером 6 × 1 см помещают в бактериологические пробирки, содержащие 5 мл минеральной среды, стерилизуют при давлении 0,5 атм в течение 30 мин и засевают изучаемыми культурами грибов 2—3-недельного возраста. Учет роста грибов и определение целлюлозолитических свойств культуральных фильтров проводят через 10—30 сут [50, 57, 408].

У.4.2. КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЛЮЛАЗ

Наиболее простыми методами определения целлюлозолитической активности являются качественные методы, которые включают визуальную оценку изменения субстрата при росте грибов на целлюлозе, состав и характеристику продуктов гидролиза целлюлозы.

У.4.2.1. ВИЗУАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТА ГРИБОВ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ

Рост грибов на целлюлозном субстрате оценивают по пятибалльной системе: 1—2 балла (+, ++) означают слабый рост мицелия гриба, спорообразование, отсутствие разрушенных участков целлюлозы; 3—4 балла (+++, ++++) — наличие обильного и хорошо развитого мицелия, обволакивающего целлюлозный субстрат. В этом случае визуально отмечается деградация субстрата.

У.4.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА САХАРОВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБОВ МЕТОДОМ КРУГОВОЙ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О целлюлозолитической активности изучаемых штаммов грибов судят по наличию и интенсивности пятен редуцирующих сахаров на хроматограмме [75].

Реактивы и оборудование: бутиловый спирт; ледяная уксусная кислота (чда); дистиллированная вода; хроматографическая бумага (ленинградская медленная); эксикатор, лодочка (4 × 35 см); микропипетки.

Последовательность определения. На лист хроматографической бумаги накладывают крышку эксикатора и обводят ее графитным карандашом. Вырезают круг диаметром 29 см. Циркулем вычерчивают окружности — стартовую диаметром 8 и наружную — 27 см; делят окружность на 8 или 16 секторов. На стартовой окружности в центре каждого сектора точками отмечают места нанесения исследуемых растворов культуральных фильтров (стартовые точки). За наружным кругом проставляют порядковые номера секторов и номера проб. В центре круга прокалывают или аккуратно вырезают круглое отверстие для фитиля. Плотный фитиль изготавливают из фильтровальной (или хроматографической) бумаги длиной 15 см и шириной 1—1,5 см. Фитиль должен плотно входить в отверстие круга. В каждом секторе на стартовую точку микропипеткой наносят исследуемые растворы. Диаметр пятна не должен превышать 3 мм. Поскольку при выращивании грибов на фильтровальной бумаге выход сахаров незначителен, для их обнаружения необходимо наносить значительное количество культурального фильтрата (до 0,1 мл). Стандартные растворы, 0,5%-ные растворы глюкозы и целлобиозы, наносят в количестве 0,001 мл. Затем на дно эксикатора ставят колбу или другой сосуд, в который наливают 50—100 мл растворителя. Хроматограмму соединяют с фитилем, нижний конец которого погружают в растворитель. Края хроматограммы кладут на бортик эксикатора, эксикатор закрывают крышкой. Разделение сахаров в камере, насыщенной парами растворителя, длится 24 ч. В качестве растворителя используют смесь: бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота и вода (65 : 5 : 30). В делительную воронку вносят указанную смесь, тщательно взбалтывают 5—10 мин и устанавливают вертикально на 3—4 ч. За это время жидкость разделяется на два слоя. Для работы используют верхний отстоявшийся слой.

После извлечения хроматограммы из камеры ее высушивают в вытяжном шкафу в течение часа и проявляют. Для проявления альдоз используют: 10 мл 96%-ного этилового спирта; 0,4 г салициловой кислоты; 0,5 мл ортотолуидина; для кетоз: 9 мл 96%-ного этилового спирта; 1 мл 1 н. водного раствора HCl; 0,1 г мочевины. Ватным тампоном проявитель наносят равномерным слоем на поверхность хроматограммы. Высушивают при комнатной температуре. После полного высыхания хроматограмму помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 100—105° С, и выдерживают 10 мин. При этой температуре на хроматограмме проявляются сахара, которые идентифицируют по стандартным растворам, глюкозе и целлобиозе.

V.4.2.3. ОБРАЗОВАНИЕ ЗОН ПРОСВЕТЛЕНИЯ

НАТРИЙКАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗНОГО АГАРА (Na-КМЦ) [221, 445]

Последовательность определения. Агаризованную среду, состоящую из цитрат-фосфатного буфера, рН 5,2, с 0,5%-ным раствором Na-КМЦ, разливают в чашки Петри; на поверхность среды помещают стеклянные цилиндрики размером 0,5 × 1,5, см и вносят в них по 0,5 мл исследуемого фильтрата. Чашки инкубируют в термостате при температуре 40° С. Зоны просветления измеряют в течение 5 сут, каждые 24 ч.

У.4.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЛОЯ РАЗЖИЖЕНИЯ ГЕЛЯ Na-КМЦ [221]

Последовательность определения. В пробирки наливают 5%-ный гель Na-КЦМ высотой 30—40 см со степенью замещения 65,5, приготовленный на цитрат-фосфатном буфере, рН 5,2. На поверхность геля осторожно наливают 0,5 мл культурального фильтрата. Инкубируют при температуре 40° С в ультратермостате. Слой разжижения измеряют в течение 5 сут, каждые 24 ч.

Из перечисленных методов для первичного отбора целлюлозолитических грибов чаще используют два первых. Отобранные целлюлозоразрушающие грибы исследуют на содержание целлюлозолитических ферментов: C_1 -, C_x -, β -глюкозидазы.

У.4.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЛЮЛАЗ

Поскольку определения, как правило, выполняют в растворах, содержащих смесь различных целлюлозолитических ферментов, то C_1 -, C_x -, β -глюкозидазную активность комплекса учитывают по их действию на разные субстраты.

При гидролизе целлюлозосодержащих материалов в промышленных условиях особое внимание уделяют определению солюбилизирующей активности, которую часто идентифицируют с C_1 -активностью. Технические методы дают представление о целлюлозолитической активности, но не указывают на количественное соотношение отдельных ферментов целлюлозолитического комплекса. Для более полной оценки целлюлозолитической активности необходимо определить активность отдельных ферментов целлюлозолитического комплекса, чтобы выяснить биохимический механизм ферментативного гидролиза целлюлозы, а также отобрать микроорганизмы, образующие эти ферменты. Солюбилизация целлюлозы вызывается синергизмом экзо- β -глюканазы и эндо- β -глюканазы [445]. Для определения солюбилизирующей активности в качестве субстрата используют хлопковое волокно, микрористаллическую целлюлозу («Avisel») или гидроцеллюлозу с последующим определением редуцирующих сахаров [689], потери массы субстрата [579] или уменьшения оптимальной плотности целлюлозной суспензии [607].

У.4.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ C_1 -ФЕРМЕНТА [384]

Активность C_1 -фермента определяют по количеству глюкозы, образовавшейся в реакционной смеси при использовании в качестве субстрата обезжиренного хлопкового волокна. Обезжиривание хлопкового волокна проводят путем экстракции этанолом в аппарате Сокслета в течение 8 ч, затем этиловым эфиром, в течение 6 ч, после чего в течение 8 ч его промывают 1%-ным раствором щелочи в атмосфере азота. Щелочь отмывают сначала горячей водой, затем 1%-ным раствором уксусной кислоты и холодной водой до нейтральной реакции. Обезжиренный хлопок (хлопковое волокно) высушивают на воздухе.

Последовательность определения. В пробирку помещают 3 мг обезжиренного хлопкового волокна, 1 мл цитрат-фосфатного буфера и 1 мл культурального фильтрата или раствора фермента, закрывают резиновой пробкой и ставят в термостат на 24 ч при оптимальных условиях реакции. Затем в реакционной смеси определяют редуцирующие сахара. Параллельно ставят контрольную реакционную смесь: 1 мл

0,1 М цитрат-фосфатного буфера, 1 мл дистиллированной воды и 3 мг хлопкового волокна. Количество редуцирующих веществ в культуральном фильтрате или в ферментном препарате рассчитывают по разности их содержания в опытной и контрольной смесях.

V.4.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУБИНЫ ОСАХАРИВАНИЯ ХЛОПКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНКУБАЦИИ [384]

Для окончательной оценки продуцентов и получаемых препаратов целлюлазы необходимо определить глубину осахаривания хлопкового волокна в течение 3 сут.

Состав реакционной смеси: 3 мг хлопкового волокна; 1 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера и 1 мл культурального фильтрата или раствора фермента при оптимальных условиях. Пробирки с реакционной смесью выдерживают в термостате 3 сут, после чего определяют образовавшиеся редуцирующие сахара методом Шомодьи-Нельсона (в процентах от взятого субстрата).

V.4.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ C_1 -КОМПОНЕНТА ЦЕЛЛЮЛАЗЫ ПО ОСАХАРИВАНИЮ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ [384]

Длительный опыт работы с целлюлозолитическими культурами грибов показал, что их способность осахаривать фильтровальную бумагу служит показателем наличия в культурах и препаратах целлюлазы C_1 -компонента. Кратковременная инкубация при осахаривании бумаги особенно удобна для оценки растущих культур грибов.

Последовательность определения. В пробирку помещают 50 мг измельченной бумаги («Фильтрак» № 3, ГДР), добавляют 2 мл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера с оптимальным для данной культуры значением рН и 0,5 мл фильтрата культуральной жидкости или раствора сухого препарата фермента в концентрации 5 мг/мл. Пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают в термостат. После инкубации смеси при оптимальном для данной культуры значении температуры в течение 1 ч определяют образовавшиеся редуцирующие сахара.

V.4.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ C_x -ФЕРМЕНТОВ [384]

Активность C_x -ферментов определяют двумя методами: по степени снижения вязкости 0,3%-ного раствора Na-КМЦ (степень этерификации 63,8%, степень полимеризации 495) и по количеству редуцирующих сахаров, образующихся в результате гидролиза указанного субстрата.

V.4.3.5. ОСАХАРИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ C_x -ФЕРМЕНТОВ [384]

Последовательность определения. К 1 мл 1%-ного раствора Na-КМЦ в цитрат-фосфатном буфере при оптимальных условиях приливают 1 мл ферментного раствора или культурального фильтрата и инкубируют в течение 30 мин. Затем определяют количество редуцирующих сахаров в 1 мл реакционной смеси.

За единицу активности фермента принимают количество редуцирующих сахаров (глюкозы) в миллиграммах, образовавшихся при действии 1 мл неразведенного фильтрата культуральной жидкости на соответствующие субстраты в условиях реакции.

V.4.3.6. ЭНДОГЛЮКАНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ С_x-ФЕРМЕНТОВ [384]

Эндоглюканазную активность определяют по снижению вязкости 0,3%-ного раствора Na-КМЦ (степень замещения 0,63, степень полимеризации 495). Вязкость определяют в вискозиметре Оствальда по времени истечения 5 мл 0,3%-ного раствора Na-КМЦ, к которому добавляют 0,7 мл культурального фильтрата и 0,3 мл цитрат-фосфатного буфера в оптимальных условиях. Разжижающую активность фермента рассчитывают по формуле $(T - T_0) \cdot 100\% / T$, где T_0 — время истечения опытного раствора (с); T — время истечения контрольного раствора (с), в котором ферменты предварительно инактивировались кипячением. Время инкубации 3 мин. Активность С_x-фермента выражают в процентах падения вязкости раствора Na-КМЦ под действием фермента [384].

V.4.3.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ β -ГЛЮКОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ [384]

β -Глюкозидазную активность определяют путем измерения увеличения содержания редуцирующих сахаров, образовавшихся под действием ферментов на целлобиозу либо *n*-нитрофенил- β -глюкозид [384].

Состав реакционной смеси: в пробирку наливают 1 мл 0,05%-ного раствора целлобиозы в цитрат-фосфатном буфере при оптимальных условиях реакции, 1 мл ферментного раствора или культурального фильтрата и инкубируют в течение 30 мин. После инкубации определяют количество редуцирующих сахаров в 1 мл реакционной смеси.

V.4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ

V.4.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДУЦИРУЮЩИХ САХАРОВ МЕТОДОМ ШОМОДЬИ — НЕЛЬСОНА [777]

Приборы и реактивы. Универсальный термостат (например, У 10, ГДР); фотоэлектроколориметр (ФЭК-56); ацетат натрия (чда); уксусная кислота (чда); бикарбонат натрия (чда); карбонат натрия (безводный; чда); калийнатрийтартрат ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$; чда); сульфат натрия безводный (чда); молибдат аммония ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$; ч); концентрированная серная кислота (хч); арсенат натрия ($Na_2HAsO_4 \times \times 7H_2O$). Для определения редуцирующих сахаров используют реактивы Шомодьи и Нельсона [777].

Реактив Шомодьи готовят последовательным растворением в 250 мл воды 24 г безводного карбоната натрия, 12 г калийнатрийтартрата, 40 мл 10%-ного водного раствора сульфата меди, 16 г бикарбоната натрия и раствора сульфата натрия (18 г в 500 мл воды, не содержащей CO_2). Объем раствора доводят до 1 л. Этот реактив хранят в темной склянке.

Реактив Нельсона готовят последовательным растворением в 400 мл воды 25 г молибдата аммония, 21 мл концентрированной серной кислоты и раствора арсената натрия (3 г в 25 мл воды). Полученный реактив доводят до 500 мл и выдерживают 2 сут при 37° С.

Последовательность определения. 50 мг хлопкового волокна хорошо смачивают в пробирке 2 мл 0,1 М ацетатного буфера и 1 мл раствора фермента или культурального фильтрата. Так как в препарате фермента могут содержаться редуцирующие вещества, готовят также контрольную смесь, не содержащую субстрата. Опытную и контрольную реакционные смеси инкубируют при 40° С в течение 1 ч, после чего опреде-

ляют содержание редуцирующих сахаров [445]. Для этого к 1 мл контрольной и опытной реакционных смесей добавляют по 1 мл раствора Шомодьи, выдерживают в кипящей бане 15 мин, охлаждают и, добавив при перемешивании 1 мл реактива Нельсона, разбавляют дистиллированной водой до 25 мл и колориметрируют при 560 нм. Интенсивность окраски опытного образца сравнивают с контрольным. Для количественного определения глюкозы строят калибровочную кривую в интервале измерений 5—100 мг % глюкозы.

V.4.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДУЦИРУЮЩИХ САХАРОВ ОРТОТОЛУИДИНОВЫМ РЕАКТИВОМ [262]

Принцип метода заключается в том, что глюкоза при нагревании с раствором ортотолуидина в уксусной кислоте дает зеленую окраску. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе; она пропорциональна содержанию глюкозы в испытуемом растворе.

Реактивы: ортотолуидин технический, ледяная уксусная кислота (чда), тиомочевина. Технический ортотолуидин требует предварительной перегонки под вакуумом. Условия перегонки; если в системе создается вакуум 80 мм рт. ст., температура перегонки составляет 121° С, 40 мм рт. ст. — 110° С, 30 мм рт. ст. — 103° С, 15 мм — 90° С. Полученный конденсат имеет слегка желтоватую окраску. Хранится в склянке с притертой пробкой на холоду. На воздухе ортотолуидин приобретает темно-вишневый цвет и становится непригодным для использования. Реактив готовят так: в 960 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 10 г тиомочевины и добавляют 40 мл перегнанного ортотолуидина. Реактив стоек и может длительно храниться.

Последовательность определения. В пробирку вносят 1 мл испытуемого раствора, 7 мл ортотолуидинового реактива и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем быстро охлаждают в ледяной воде. Окраску смеси измеряют на ФЭК-56 при 560 нм. Для количественного определения глюкозы в испытуемых растворах строят калибровочную кривую в интервале измерений 5—200 мг % глюкозы.

V.4.4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ

Метод основан на следующей реакции [271]: глюкозооксидаза (β -D-глюкоза; O_2 -оксидоредуктаза (К.Ф. 1.1.3.4)) избирательно переносит два атома водорода от первого углеродного атома β -D-глюкозы на кислород воздуха. Пероксидаза за счет атомарного кислорода перекиси водорода окисляет лейкоформу хромогенного акцептора кислорода. В качестве заменителя пероксидазы используют кристаллический бычий гемоглобин. При окислении хромогенного акцептора появляется окраска, по интенсивности которой судят о количестве окисленной глюкозы.

Реактивы: 0,9%-ный раствор NaCl; 5%-ный раствор $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4 н. раствор NaOH; 1%-ный спиртовой раствор о-дианизидина; 0,4 М калий-фосфатный буфер, pH 5,9, который готовят смешиванием 0,4 М растворов K_2HPO_4 и KH_2PO_4 в соотношении 2 : 8; препарат глюкозооксидазы; кристаллический гемоглобин крупного рогатого скота; стандартные растворы глюкозы — 50, 100, 150 мг%, приготовленные на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; 50%-ный раствор H_2SO_4 .

Состав рабочего реактива для определения глюкозы: к 15 мл 0,4 М калий-фосфатного буфера прибавляют 1—3 мг глюкозооксидазы (табл.

Т а б л и ц а 12. Зависимость активности препаратов глюкозооксидазы и гемоглобина крупного рогатого скота от их количества, которое должно содержаться в реактиве для определения глюкозы

Активность препара- тов глюкозооксидазы		Содержание в 1 л реактива		Актив- ность пре- паратов гемогло- бина (пур- пурогали- новых единиц в 1 г пре- парата)	Содержание в 1 л реактива	
QO ₂	ед./г препарата	глюкозо- оксидазы, ед	препарата глюкозо- оксидазы, мг		перокси- дазы, ед.	препарата гемогло- бина, мг
80 000	59 500	1650	27,7	0,525	0,056	106,0
120 000	89 281	1650	18,4	0,625	0,056	83,0
180 000	133 928	1650	12,2	0,700	0,056	80,0
220 000	163 660	1650	10,0	1,00	0,056	56,0
260 000	193 437	1650	8,5	1,25	0,056	45,0

Пр и м е ч а н и е. 1 единица активности глюкозооксидазы соответствует окис-
лению 22,4 мкл кислорода в 1 мин.

12) и 8—10 мг гемоглобина. Смесь перемешивают, прибавляют 1 мл спиртового раствора о-дианизидина и затем дистиллированную воду до 200 мл. Реактив хранят на холоду в темной склянке, срок хране-
ния — до 2 нед.

Последовательность определения. В центрифужной пробирке сме-
шивают 1,1 мл NaCl; 0,4 мл ZnSO₄ · 7H₂O; 0,4 мл NaOH. К смеси прибавляют 0,1 мл испытуемого раствора или 0,1 мл стандартного раствора глюкозы, перемешивают и центрифугируют 5 мин при n = 3000—4000 об/мин. Затем 1 мл центрифугата помещают в мерную про-
бирку на 10 мл, прибавляют 3 мл рабочего реактива. Смеси переме-
шивают и инкубируют 30 мин в водяной бане при 45°С. По окончании инкубации пробирки переносят в ледяную воду, охлаждают и тут же приливают 50%-ную H₂SO₄ до 10 мл. Появляется стабильная вишнево-
красная окраска. Ее интенсивность измеряют на ФЭКе с зеленым свето-
фильтром против контроля (1 мл воды + 3 мл реактива + H₂SO₄). Кон-
центрацию глюкозы определяют по стандартной кривой, выведенной со стандартными растворами глюкозы — 50, 100, 150 мг%.

V.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КСИЛАЗ

V.5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Ксиланы входят в состав гемицеллюлоз и представляют собой полипентозаны, образованные из остатков β-D-ксилопиранозы (C₅H₁₀O₅), соединенных между собой 1,3- и 1,4-связями. Ксиланы содержатся в соломе (до 20%), древесине (до 25%), кукурузных кочерыжках (до 35%) [48, 49, 51, 56, 58, 62].

Ксиланаза (β-1,4-ксиланксиланогидролаза, К.Ф.3.2.1.8) гидро-
лизует β-1,3- и β-1,4-ксилановые связи при расщеплении ксилана,

образуя β -D-ксилозу. В ферментативном гидролизе ксилана участвует комплекс ксиланаз, состоящий из эндоксилазы, осуществляющей неупорядоченное расщепление ксилана с образованием олигосахаридов (разжижающая ксиланаза), и β -ксилозидазы, гидролизующей ксиланы с восстановленного конца цепи с образованием β -D-ксилозы (осахаривающая ксиланаза) (рис. 88).

Ксиланы поступают в почву в значительных количествах при разложении злаков и играют важную роль в круговороте углерода в при-

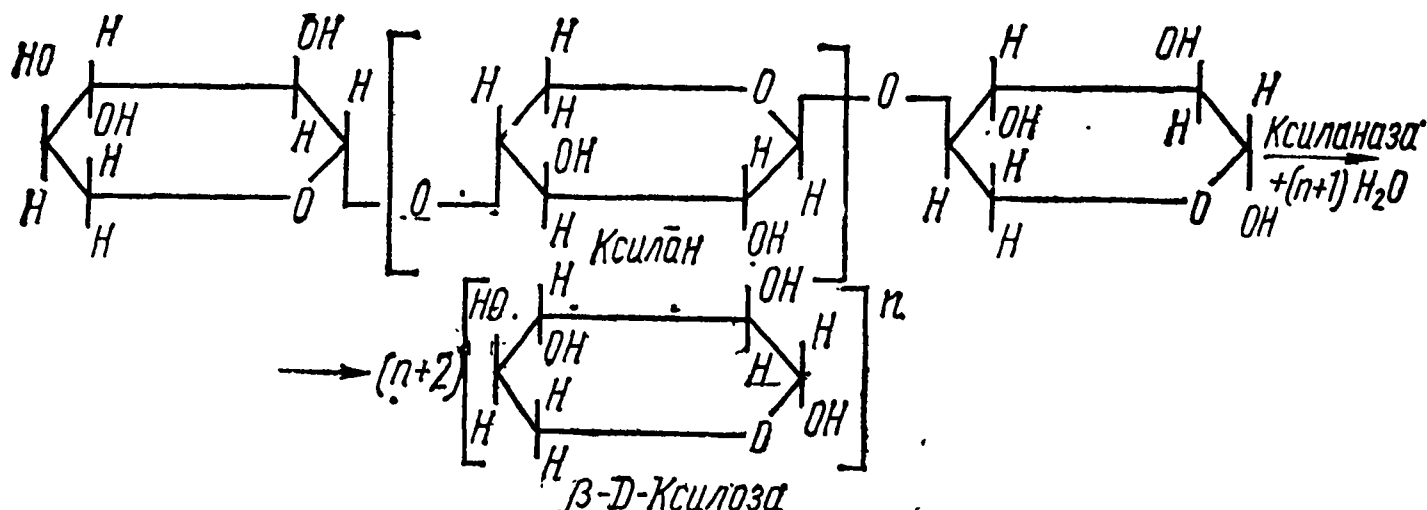


Рис. 88. Схема строения молекулы ксилана и ее ферментативный гидролиз.

роде. Ксилоза, образующаяся при гидролизе ксилана под действием ксиланазы, служит энергетическим материалом для почвенных микроорганизмов: фузариев, пенициллиев, триходерм, гельминтоспориев и других несовершенных грибов, обладающих способностью синтезировать комплекс гидролитических ферментов. При изучении ксилангидролизующих свойств несовершенных грибов их выращивают на жидкой минеральной среде Чапека, где в качестве единственного источника углерода используют химически чистый ксилан. Учет роста грибов проводят визуально на 3-, 6- и 10-е сут [56], а в культуральной жидкости определяют наличие продуктов гидролиза ксилана.

V.5.2. КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КСИЛАНАЗ [350, 383, 384, 452]

Качественные методы определения ксиланазной активности включают визуальную оценку интенсивности роста грибов на среде, содержащей 0,5% ксилана, изменения субстрата и определение в культуральной жидкости грибов состава продуктов гидролиза методом круговой бумажной хроматографии. Эти методы подробно изложены в разделе V.4.4.1. Для идентификации продуктов гидролиза ксилана в качестве метчиков используют 0,5%-ные стандартные растворы ксилозы, арабинозы и глюкозы в количестве 0,001 мл и кислотный гидролизат ксилана [269].

V.5.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КСИЛАНАЗ [140, 269, 292, 318]

Методы определения активности ксиланаз в культуральной жидкости грибов основаны на определении в реакционной смеси содержания редуцирующих сахаров, образующихся при гидролизе ксилана. Редуцирующие сахара представляют собой смесь ксилоолигосахари-

д^{тв} и ксилозы (ксилоолигосахариды под действием β-ксилозидазы частично гидролизуются до ксилозы), количество редуцирующих сахаров измеряют методами йодометрического титрования по реакции восстановления меди (метод Серенсена) или колориметрического определения с помощью реактивов Нельсона и Шомодьи. Последний метод подробно изложен в разделе (V.4.4.1).

V.5.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСИЛОЗЫ МЕТОДОМ СЕРЕНСЕНА

Содержание ксилозы, образующейся при ферментативном гидролизе ксилана, определяют по ее восстанавливающей активности с помощью йодометрического титрования. В колбу Эрленмейера емкостью 50 мл, содержащую 5 мл 1%-ного раствора ксилана, добавляют 5 мл ацетатного буфера, рН 5,4, и 1 мл исследуемой культуральной жидкости. В контрольных пробах раствор ксилана заменен дистиллированной водой (5 мл). Закрытые колбы помещают на 1 ч в термостат при 42° С и через определенные промежутки времени взбалтывают. Затем суспензию центрифугируют и отбирают по 1 мл надосадочной жидкости для определения редуцирующей способности ксилозы.

Последовательность определения. В термостойкой пробирке с притертой пробкой смешивают 5 мл реакционной смеси с 5 мл медно-фосфатного реактива. Пробирку закрывают и осторожно нагревают на водяной бане в течение 10 мин, а затем охлаждают. Для окисления выпавшего красного осадка закиси меди (Cu_2O) осторожно по стенке пробирки, не смешивая с содержимым, добавляют 5—10 мл 0,005 н. раствора йодистого калия. Затем пипеткой с расширенным сливным отверстием быстро приливают 1,5 мл 2 н. серной кислоты и сразу же взбалтывают. Остаток йодистого калия оттитровывают 0,005 н. раствором тиосульфата натрия. По разнице между первоначально внесенным и определенным содержанием йодистого калия устанавливают его количество, вступившее в реакцию с эквивалентным количеством меди (1 мл 0,005 н. растворов $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ или КJ соответствует 1 мл 0,005 н. раствора закиси меди). Для расчета количества ксилозы в реакционном растворе экспериментально устанавливают эквивалент 1 мг ксилозы в миллилитрах 0,005 н. раствора закиси меди. Для этого в пробирки приливают по 5 мл раствора ксилозы (концентрация 0,2 мг в 1 мл); смешивают с 5 мл медно-фосфатного реактива. Пробирки закрывают и нагревают на водяной бане в течение 10 мин.

Осаждение меди и титрование тиосульфатом натрия проводят, как описано выше. По количеству йодистого калия, израсходованного на окисление меди, устанавливают эквивалентное количество его, выраженное в миллилитрах 0,005 н. раствора закиси меди. Например, 1 мг ксилозы соответствует 7,40 мл 0,005 н. раствора закиси меди, т. е. 1 мл 0,005 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 0,135 мг ксилозы ($1 : 7,4 = 0,135$ мг). Ксиланазную активность 1 мл культуральной жидкости выражают в миллиграммах ксилозы на 1 мл реакционной смеси.

Реактивы: 1) 0,2 М раствор ацетатного буфера (рН 5,4); 2) ксилан; при отсутствии готового препарата его можно получить из кукурузных кочерыжек или пшеничной соломы экстракцией 6%-ным раствором NaOH и осаждением этиловым спиртом [140]; 3) медно-фосфатный реактив: 28 г безводного K_2HPO_4 и 40 г сегнетовой соли растворяют в 700 мл воды, добавляют 100 мл 1 н. раствора NaOH и затем вносят 80 мл 10%-ного раствора $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. После растворения добавляют 180 г безводного Na_2SO_4 , и весь объем раствора доводят до 1 л. Раствор отстаивают 1—2 ч, затем декантируют или фильтруют; 4) 0,005 н. КJ;

5) 2 н. H_2SO_4 ; 6) 0,005 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ готовят разбавлением 0,1 н. основного раствора перед титрованием. При разбавлении на 1 л раствора добавляют 2 мл 10%-ного раствора NaOH ; 7) раствор ксилозы в концентрации 1 мг в 1 мл.

V.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

V.6.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Пектолитические ферменты катализируют превращения пектиновых веществ (рис. 89) — склеивающего субстрата растительных клеток [48]. В состав комплекса пектолитических ферментов входят пектинэстераза, полигалактуроназы. *Пектинэстераза* (К.Ф.3.1.1.11) катализирует гидролиз сложноэфирных связей в молекуле пектина с

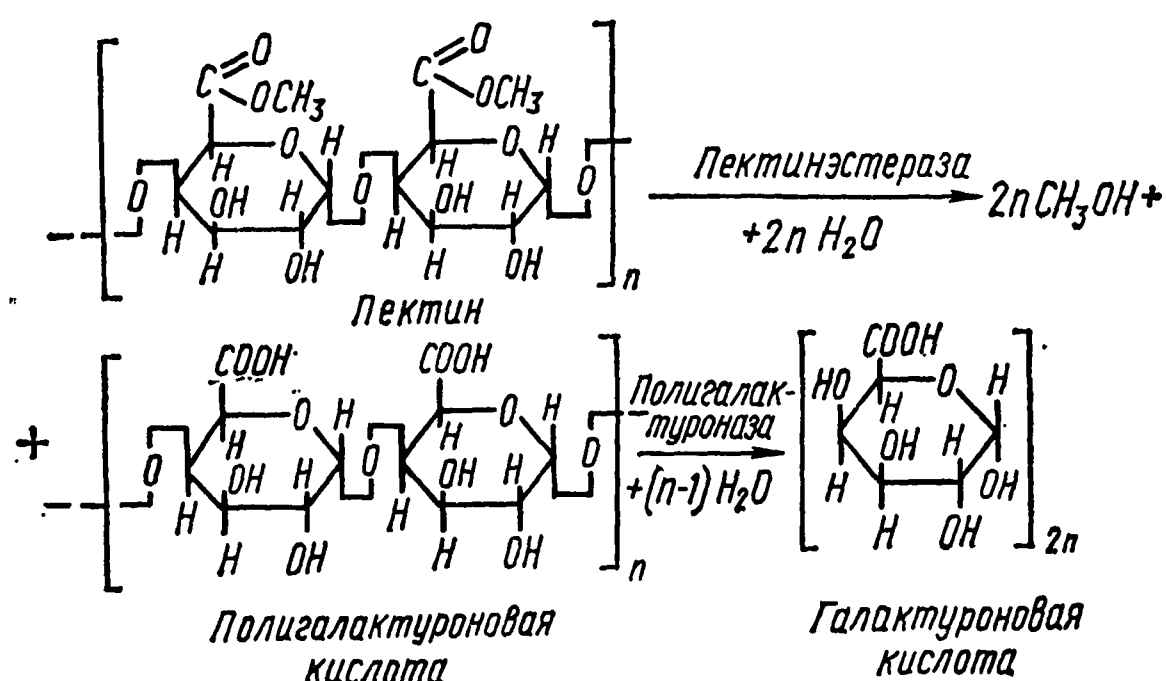


Рис. 89. Ферментативный гидролиз молекулы растворимого пектина.

образованием метилового спирта и свободных карбоксильных групп. *Полигалактуроназы* катализируют гидролиз полигалактуроновой кислоты по гликозидным связям с образованием остатков галактуроновой кислоты. По характеру и относительной скорости гидролиза пектина и пектиновой кислоты различают эндо- (К.Ф.3.2.1.15) и экзо- (К.Ф. 3.2.1.40) полигалактуроназы.

Известно несколько качественных и количественных методов определения пектиназ.

V.6.2. КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕКТИНАЗ

Наиболее простые методы: определение мацерирующей способности по степени мацерации растительной ткани под действием культуральной жидкости после роста гриба или вытяжки из его мицелия [649] и по степени роста грибов на минеральной среде с 0,5% пектина в качестве источника углерода (последний метод обычно используют для выявления пектиназ при первичном отборе) [1].

V.6.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МАЦЕРАЦИЕЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Тонкие срезы корней моркови, картофельных клубней и других корнеплодов помещают в пробирку или на предметное стекло в стерильный фильтрат культуральной жидкости исследуемого гриба, который культивировался на среде с пектинсодержащим субстратом. Срез выдерживают при 30° С. Через различные промежутки времени наблюдают под микроскопом процесс мацерации ткани, т. е. распад ее на отдельные клетки. Мацерация ткани свидетельствует о наличии пектиназ, а время ее наступления — показатель их относительной активности.

V.6.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПО СТЕПЕНИ РОСТА ГРИБОВ

Грибы выращивают на минеральной среде с 0,5% пектина и определяют интенсивность роста мицелия визуально и по сухой массе мицелия в разные сроки культивирования. Одновременно визуально определяют время исчезновения нерастворимого пектина. В культуральной жидкости штаммов разного возраста определяют наличие продуктов гидролиза пектина, по которым судят о степени его гидролиза. Для характеристики содержания и состава продуктов гидролиза пектина — галактуроновой кислоты и олигогалактуронидов — применяют метод восходящей или круговой бумажной хроматографии [75]. На хроматографическую бумагу микропипеткой наносят на линию старта по 0,01 мл ферментных гидролизатов. Хроматографическую бумагу помещают в герметический сосуд с растворителем, в состав которого входит смесь уксусной кислоты, *n*-бутилового спирта и воды в соотношении 1 : 4 : 5. Через 20 ч бумагу вынимают, подсушивают и проявляют анилин-фталатом: опрыскивают раствором насыщенного водной *n*-бутилового спирта (100 мл), содержащего 1,6 г фталевой кислоты и 0,7 мл свежеперегнанного анилина [250]. После опрыскивания хроматограмму выдерживают несколько минут в сушильном шкафу при 105° С. Галактуроновая кислота проявляется темно-розовым пятном, полигалактурониды — пятнами иного оттенка. В качестве метчиков используют 0,5%-ные растворы *D*-галактуроновой кислоты и сахаров: галактозы, арабинозы, глюкозы, ксилозы. За процессом гидролиза наблюдают в течение 6—8 сут. Содержание продуктов гидролиза пектина определяют в спиртовых элюатах проявленных пятен олигогалактуронидов и галактуроновой кислоты на ФЭК-М при длине волны 430—460 нм [85]. Содержание в культуральной жидкости продуктов гидролиза пектина является показателем не только активности, но и характера гидролиза пектина. Преобладание галактуроновой кислоты свидетельствует о концевом механизме гидролиза, а преимущественное содержание олигогалактуронидов — о наличии эндополигалактуроназ.

V.6.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Пектинэстеразную активность (ПЭА) определяют по приросту свободных карбоксильных групп или по количеству образовавшегося метилового спирта. Наиболее распространен титрометрический метод

определения ПЭА по увеличению кислотности [266], при этом в реакционной смеси поддерживают постоянное значение рН. За единицу ПЭА принимают количество фермента, которое катализирует при 30° С и оптимальном рН гидролиз 1 мкэкв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин. Субстрат — 1%-ный раствор свекловичного пектина со степенью метоксилирования не менее 80%. ПЭА выражают числом указанных единиц в 1 г (или 1 мл) исследуемой пробы.

Значение ПЭА зависит от степени этерификации пектина. При работе с различными субстратами сравнимые результаты получаются только при пересчете полученных данных на субстрат со 100%-ной степенью метоксилирования. В упомянутых условиях определения количество расщепленных сложноэфирных связей пропорционально количеству фермента в пределах 20% гидролиза.

V.6.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕКТИНЭСТЕРАЗЫ

Последовательность определения. Готовят реакционную смесь, состоящую из 20 мл 1%-ного раствора пектина, рН 4,0 (способ приготовления — см. раздел V.6.3.2) и 10 мл культурального фильтрата (разведение подбирают экспериментально, и если для определения берут меньше 10 мл культурального фильтрата, то недостающий объем дополняют дистиллированной водой, т. е. общий объем реакционной смеси должен быть равен 30 мл). Опытную пробу инкубируют в термостате в течение 1 ч при $30 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Для приготовления контрольной пробы культуральный фильтрат, помещенный в колбу, закрытую пробкой с воздушным холодильником, выдерживают в кипящей водяной бане 1 ч для инаktivации фермента. Обе пробы с помощью потенциометра титруют из микробюретки 0,1 н. раствором щелочи до рН 7,5.

По разности между количеством щелочи, затраченной на титрование опытного и контрольного растворов, находят количество 0,1 н. едкого натра, необходимое для титрования освободившихся в результате действия фермента карбоксильных групп. Значение ПЭА рассчитывают по формуле $\text{ПЭА} = 100a100/t\sigma x$, где a — количество 0,1 н. едкого натра (мл); 100 — число прогидролизированных сложноэфирных связей (мкэкв), соответствующее 1 мл 0,1 н. едкого натра; 100 — степень этерификации пектина, используемая при расчете; t — время гидролиза (мин); σ — количество ферментного препарата (г) или культурального фильтрата (мл), взятое на анализ; x — степень этерификации пектина, использованного в качестве субстрата.

Активность полигалактуроназ определяют обычно по увеличению количества конечных восстанавливающих групп (в результате освобождения альдегидных групп галактуроновой кислоты или ее полимеров), определяемых йодометрически [393] и по снижению вязкости раствора пектина [266].

V.6.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕКТИНЭСТЕРАЗЫ И ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗ

Для определения активности этих ферментов разработан интерферометрический метод с использованием интерферометра ИТР-2 [393]. При этом за единицу пектолитической активности принимают количество фермента, которое катализирует за 1 ч при рН 4,0 и температуре 30° С превращение 1 г пектина в продукты, не осаждаемые сернокислым цинком (при проведении гидролиза в принятых условиях

соотношение фермент — субстрат в реакционной смеси обеспечивает гидролиз 30% пектина, взятого на ферментативную реакцию). Пектолитическую активность выражают числом указанных единиц в 1 г (или 1 мл) исследуемого образца.

При приготовлении субстрата используют свекловичный пектин (МРТУ 18/196—67), содержащий не менее 70% пектина со степенью метоксилирования не менее 35%. Для приготовления 1%-ного раствора навеску пектина, взятую с таким расчетом, чтобы в 200 мл раствора содержалось 2 г чистого пектина (по данным анализа), тонкой струей всыпают при непрерывном перемешивании в коническую колбу емкостью 300 мл, куда предварительно наливают около 130 мл дистиллированной воды. Перемешивают 10 мин, после чего раствор оставляют на 3 ч (можно на ночь) при комнатной температуре. По истечении этого времени в раствор добавляют при перемешивании концентрированный раствор аммиака в количестве, предварительно установленном опытным путем, для получения значения рН 4,0. Затем раствор пектина количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, объем доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через два слоя марли. Раствором можно пользоваться в течение 4 сут при условии хранения его в холодильнике (4 — 6° С). 15%-ный раствор сернокислого цинка готовят растворением 15 г сернокислого цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ по ГОСТ 4174—69) в 85 мл дистиллированной воды.

Интерферометр проверяют 0,25%-ным раствором сахарозы, который наливают в левое отделение кюветы интерферометра с длиной грани 4 см, а правое отделение кюветы заполняют дистиллированной водой. Поправочный коэффициент (К) определяют по формуле $K = x/x_1$, где x — показание прибора (должно равняться 780); x_1 — отклонение от показания прибора.

Для анализа берут несколько пробирок (диаметром 2 см и высотой 18 см) по количеству анализируемых проб, наливают в каждую по 20 мл субстрата и ставят в ультратермостат или водяную баню с температурой $30 \pm 0,2^\circ \text{C}$. Пробирки выдерживают в ультратермостате в течение 10 мин для того, чтобы их содержимое приняло указанную температуру. Затем, не вынимая пробирок из ультратермостата, наливают в каждую по 10 мл анализируемого ферментного раствора (или культуральную жидкость); содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют в ультратермостате при 30°C на 1 ч. По истечении этого времени пробирки с реакционной смесью вынимают из ультратермостата, добавляют в каждую по 2 мл 15%-ного раствора сернокислого цинка для инактивации фермента и осаждения высокомолекулярных продуктов пектолиза. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Одновременно готовят контрольные растворы. Для этого в пробирки наливают по 2 мл 15%-ного раствора сернокислого цинка, 10 мл анализируемой культуральной жидкости и 20 мл субстрата. Содержимое пробирок энергично встряхивают в течение 2—3 мин до образования легко перемешивающегося раствора, после чего фильтруют. Далее на интерферометре по инструкции, приложенной к прибору, определяют величину смещения интерференционных полос, возникающего вследствие различия показателей преломления контрольного и исследуемого растворов. Для этого исследуемый раствор наливают в левое отделение кюветы интерферометра с длиной грани 4 см, а контрольный раствор — в правое отделение кюветы. Отсчет ведут по шкале барабана прибора. Для обеспечения точности анализа разведения ферментов

необходимо подбирать таким образом, чтобы показания прибора не выходили за пределы 400—1250.

На основании полученных данных определяют пектолитическую активность в условных единицах по уравнению $P_k A = (0,06425 M + 19,62)/m \cdot 1000$ усл. ед./мл, где M — показание прибора для данного разведения; m — количество культуральной жидкости (мл), взятой на определение, или количество ферментного препарата, содержащегося в 10 мл ферментного раствора, взятого на определение (г); 0,06425; 19,62; 1000 — постоянные коэффициенты, полученные при математической обработке экспериментальных данных по изучению зависимости между количеством образующихся продуктов гидролиза пектина в условиях метода и количеством единиц активности фермента, взятого на анализ. В случае отклонения от показаний прибора (x) в формулу для определения $P_k A$ вводят поправочный коэффициент K ($M \cdot K$).

Метод учета количества прогидролизованых α -1,4-гликозидных связей по увеличению конечных восстанавливающих альдегидных групп в большей степени характеризует активность экзополигалактуроназы. За единицу экзополигалактуроназной активности принимают количество фермента, которое в условиях определения при 30° С катализирует гидролиз 1 мкэкв гликозидных связей в молекуле пектовой кислоты за 1 мин; активность выражают числом указанных единиц в 1 г препарата (или 1 мл раствора).

У.6.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗОПОЛИГАЛАКТУРОНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Активность экзополигалактуроназ определяют по увеличению количества восстанавливающих альдегидных групп (ПГА/А). Готовят 1%-ный раствор пектовой кислоты, для чего навеску пектовой кислоты, взятую с таким расчетом, чтобы в 100 мл раствора содержался 1 г этой кислоты, медленно всыпают при тщательном перемешивании в стакан с дистиллированной водой, добавляют при перемешивании из бюретки по каплям 1 н. раствор едкого натра, доводя рН раствора кислоты до 4,0. Полученный раствор пектовой кислоты количественно переносят в мерную колбу соответствующей емкости, объем доводят до метки дистиллированной водой, содержимое колбы перемешивают и фильтруют через два слоя марли на воронке Бюхнера. Раствор используют в день приготовления. Затем в колбах емкостью на 100 мл готовят реакцию смесь, состоящую из 10 мл 1%-ного раствора пектовой кислоты и 5 мл культурального фильтрата (разведение подбирают в зависимости от активности исследуемого ферментного раствора). Общий объем реакционной смеси — 15 мл.

Если для определения берут менее 5 мл раствора фермента, то недостающий объем дополняют дистиллированной водой, которую вводят непосредственно перед добавлением фермента. Пробы инкубируют в термостате при температуре $30 \pm 0,2^\circ \text{C}$ в течение 10, 20, 30 или 60 мин в зависимости от ферментативной активности, добавляют 1,8 мл 1М раствора углекислого натрия (106 г углекислого натрия в 1 л дистиллированной воды) (ГОСТ 83—63) и 10 мл 0,1 н. раствора йода (25 г йодистого калия по ГОСТ 4232—65 растворяют в колбе емкостью 1 л в небольшом количестве дистиллированной воды, помещая туда же 12,7 г йода по ГОСТ 4159—64. После растворения йода объем раствора доводят до метки дистиллированной водой). Содержимое колб перемешивают, закрывают стеклянными пробками и выдерживают 20 мин в темноте. Затем вводят по 2 мл 2 М раствора серной кислоты (200 г концентрированной серной кислоты по ГОСТ 4204—66 разбавляют

водой до 1 л) и оттитровывают избыток йода 0,05 н. раствором гипосульфита в присутствии крахмала. Результаты титрования выражают в миллилитрах 0,1 н. раствора гипосульфита. В контрольное определение культуральный фильтрат вводят после добавления углекислого натрия, непосредственно перед прибавлением раствора йода.

Для приготовления 0,05 н. раствора гипосульфита 12,5 г серноватистокислого натрия (ГОСТ 4215—66) растворяют в 1 л дистиллированной воды, а титр серноватистокислого натрия устанавливают по двуххромовокиислому калию (ГОСТ 4220—65).

Для приготовления индикатора — 1%-ного раствора крахмала в насыщенном растворе хлористого натрия — 1 г крахмала (ГОСТ 10163—62) помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляют 25 мл раствора хлористого натрия, перемешивают, добавляют еще 25 мл хлористого натрия, помещают колбу в кипящую водяную баню (при непрерывном перемешивании) до полного растворения крахмала. Содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и доводят объем жидкости до метки раствором хлористого натрия. Экзополигалактуроназную активность рассчитывают по формуле $ПГА = 51,3 a/t\sigma$, где 51,3 — число микроэквивалентов альдегидных групп, соответствующих 1 мл 0,1 н. раствора йода (или гипосульфита); a — количество 0,1 н. раствора йода, затраченное на окисление образовавшихся при пектолизе альдегидных групп, которое находят по разности объемов раствора гипосульфита, затраченных на титрование опытной и контрольной проб (мл); t — время пектолиза (мин); σ — количество препарата в пробе, взятое на титрование культурального фильтрата (г или мг). Для расчета ПГА могут быть использованы данные, полученные в пределах 20% гидролиза пектовой кислоты.

Вискозиметрический метод определения активности пектолитических ферментов, основанный на гидролизе пектина ферментным препаратом или культуральной жидкостью с учетом степени расщепления пектина по проценту снижения вязкости, характеризует активность эндополигалактуроназы, играющей основную роль в снижении вязкости раствора пектина. За единицу пектолитической активности, измеряемой по вязкости, принимают количество фермента, которое в строго определенных условиях при температуре 30° С за 10 мин катализирует гидролиз 1 г пектина со снижением вязкости раствора на 30%.

У.6.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РАЗЖИЖАЮЩЕЙ ЭНДОПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ

Активность эндополигалактуроназы определяют вискозиметрическим методом (ПГС/В) в вискозиметре Оствальда ($d = 0,73$ мм).

Состав реакционной смеси: 10 мл 1%-ного раствора пектина и 1—5 мл культурального фильтрата (разведение подбирают экспериментально). Через 10 мин инкубирования опытной смеси в термостате при 30° С измеряют вязкость раствора по времени истечения реакционной смеси. В контрольной пробе фермент инактивируют кипячением. По снижению вязкости (в процентах) определяют степень гидролиза пектина. Интерполированием находят количество культурального фильтрата (мл), которое снижает вязкость на 30%. Найденную величину (a) используют для расчета ПГА по вязкости: $V = (t_k - t) \cdot 100 / (t_k - t_b)$, где V — снижение вязкости (%); t_k — время истечения контрольного раствора пектина с инактивированным ферментом или водой (с); t — время истечения опытного раствора пектина с ферментом после пектолиза (с); t_b — время истечения растворителя с инактивиро-

ванным ферментом или водой (с); $\text{ПГС}/\text{В} = 0,1/a$, где 0,1 — постоянная величина; a — найденное интерполированием количество ферментного препарата (мг) или культурального фильтрата (мл), снижающее вязкость раствора пектина на 30%.

V.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ, РАСЩЕПЛЯЮЩИХ САХАРОЗУ

V.7.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Инвертаза (сахароза) — комплекс ферментов, широко распространенных среди микроскопических грибов [48], которые осуществляют гидролитическое и трансферазное расщепление сахарозы и ее производных.

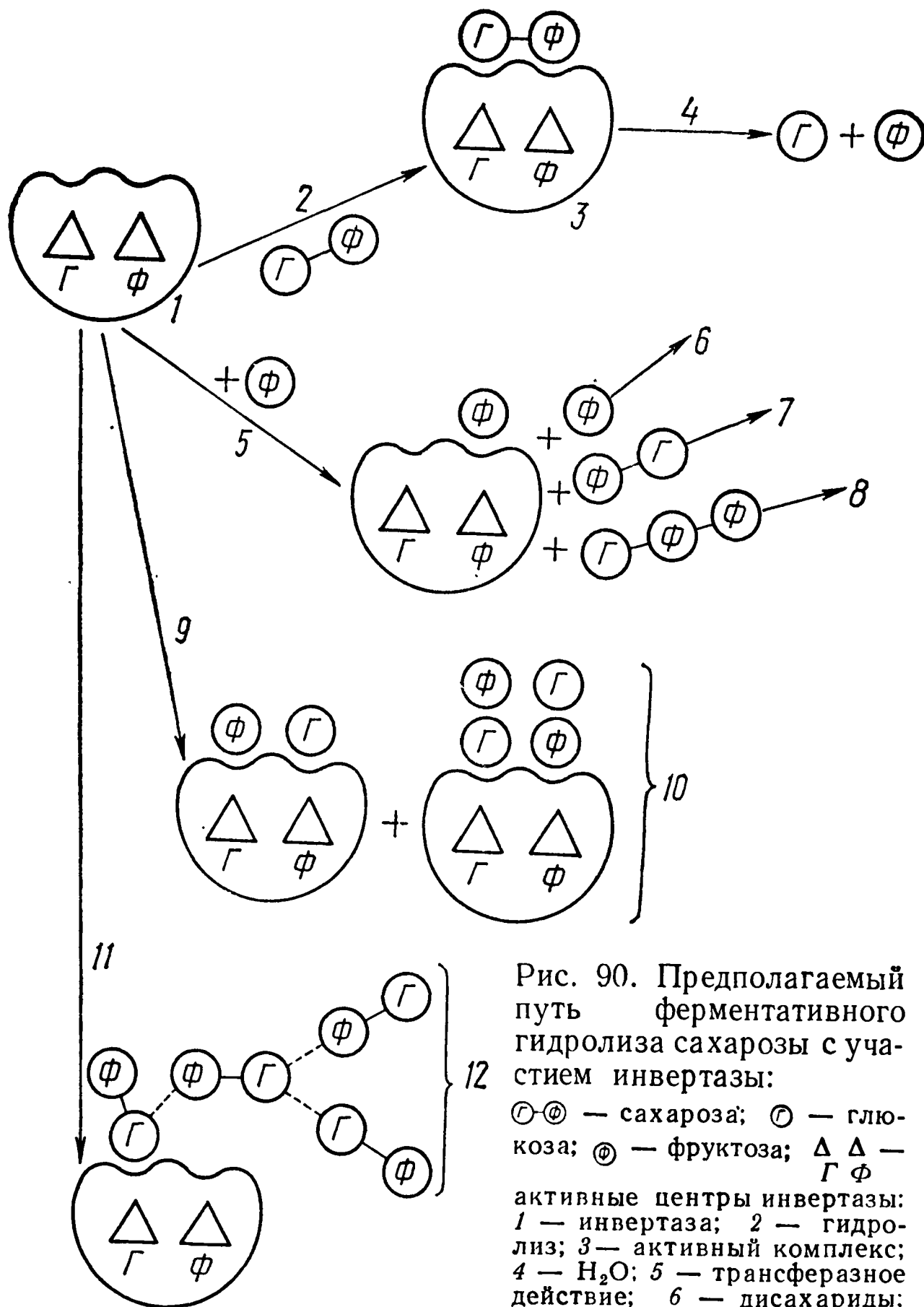


Рис. 90. Предполагаемый путь ферментативного гидролиза сахарозы с участием инвертазы:

Г-Ф — сахароза; Г — глюкоза; Ф — фруктоза; $\Delta \Delta$ — Г Ф

активные центры инвертазы: 1 — инвертаза; 2 — гидролиз; 3 — активный комплекс; 4 — H_2O ; 5 — трансферазное действие; 6 — дисахариды; 7 — трисахариды; 8 — тет-

расахариды; 9 — ингибция субстратом; 10 — неактивные комплексы; 11 — агрегация субстрата; 12 — скопление молекул сахарозы, связанных водородными связями (комплекс не образуется)

водных (рис. 90). При гидролитическом расщеплении сахарозы инвертаза проявляет сродство к остатку глюкозы, т. е. к α -глюкопиранозиду, и поэтому называется α -глюкопиранозидазой (α -глюкозидглюкогидролазой, К.Ф.3.2.1.20). По этому же принципу фермент способен расщеплять другие олигосахариды. Исключение составляет раффиноза, α -глюкозил которой связан, с одной стороны, остатком галактозы, а с другой — остатком фруктозы. Инвертаза проявляет сродство к β -фруктофуранозиду, присоединяясь к субстрату со стороны остатка фруктозы, и в этом случае называется β -фруктофуранозидазой (β -

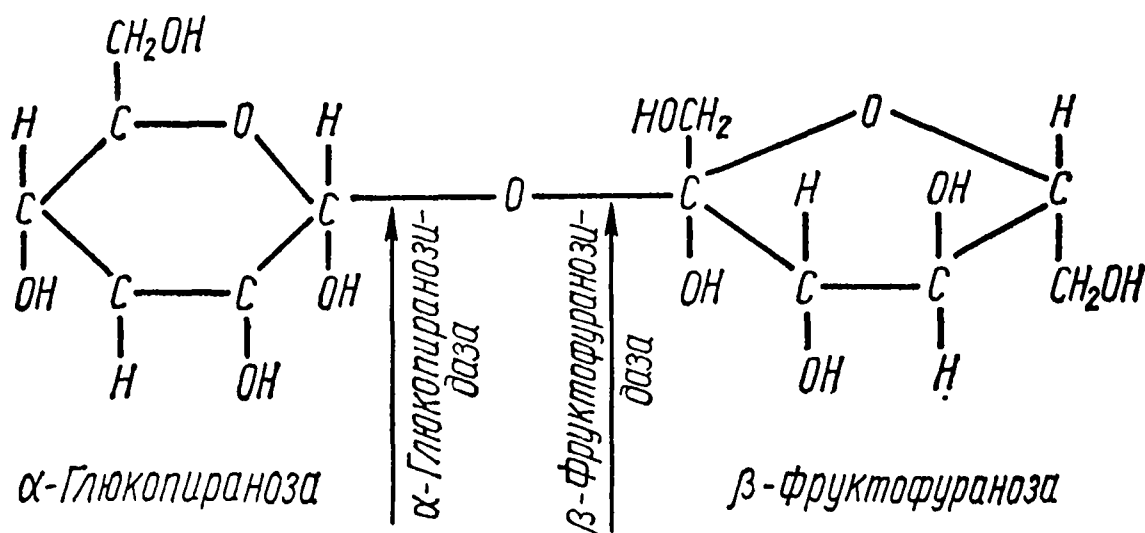


Рис. 91. Схема ферментативного гидролиза сахарозы [236].

D -фруктофуранозидгидролазой, К.Ф.3.2.1.26). β -Фруктофуранозидаза способна гидролизовать кроме сахарозы другие сахара, содержащие свободный β -фруктофуранозил. Гидролиз сахарозы как со стороны α -глюкозила, или α -глюкопиранозила, так и со стороны β -фруктофуранозида приводит к накоплению глюкозы и фруктозы (рис. 91).

Инвертаза способна переносить отщепленные остатки на другие соединения с образованием соответствующих олигосахаридов. В таком случае α -глюкопиранозидаза называется α -глюкозилтрансферазой. К этой группе сахараз относится сахарозофосфорилаза (К.Ф.2.4.1.7), амилосахараза (К.Ф.2.4.1.4) и декстрансахараза (К.Ф.2.4.1.5). Фермент, выполняющий перенос остатков фруктозы, называется β -фруктозилтрансферазой, он участвует в синтезе фруктозидов инулина и левана. Ферменты, осуществляющие начальные этапы расщепления сахарозы, изучены недостаточно. Предполагают, что ферментативная активность сахараз обратима.

V.7.2. КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РАСЩЕПЛЕНИЯ САХАРОЗЫ

V.7.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДУЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ФИЛЬТРАТАХ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

При культивировании микромицетов на синтетических средах в качестве источника углерода обычно используют сахарозу. Продукты расщепления сахарозы накапливаются в культуральной жидкости. Анализ редуцирующих сахаров методом бумажной хроматографии по Бояркину [75] позволяет качественно оценить характер и скорость потребления сахарозы [328].

V.7.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ В РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ОТМЫТЫМ МИЦЕЛИЕМ

Инкубационная среда для определения редуцирующих веществ включает 10%-ный раствор химически чистой сахарозы, смесь солей для активации процессов трансгексозилирования, 10% прессованного отмытого мицелия или культуральной жидкости и 8—10% толуола. Смесь солей содержит (мг): 520 KCl; 400 MgCl₂; 220 CaCl₂; 400 KHCO₃; до 100 мл воды. Реакционную смесь помещают в термостат при температуре 28° С. Пробы отбирают через 2, 4, 24 и 48 ч и прогревают в течение 5 мин. Контролем служат пробы, прогретые до инкубации [330]. После прогревания пробы фильтруют и анализируют состав сахаров методом бумажной хроматографии по Бояркину [75]. Растворитель — бутанол:пиридин:вода (3 : 2 : 1,5), проявитель — анилин-гидрофталат. Анилингидрофталат готовят следующим образом: 1,66 г фталевой кислоты растворяют в 95 мл водонасыщенного *n*-бутанола, добавляют 0,93 г перегнанного анилина и доводят объем раствора до 100 мл дистиллированной водой. Хранят в темной склянке.

V.7.3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

V.7.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИНВЕРТАЗЫ

Методы определения гидролитической активности инвертазы включают два этапа: 1) инкубация препарата фермента (внеклеточного — культуральная жидкость или внутриклеточного — мицелий) с раствором сахарозы; 2) определение редуцирующих сахаров либо одной глюкозы, образующейся при расщеплении сахарозы. Активность инвертазы выражают в единицах на 1 мл культуральной жидкости либо на 1 мг белка, содержащегося в 1 мл культуральной жидкости.

Для определения внутриклеточной инвертазы 5 — 40 г сырого мицелия суспендируют в 40 мл 0,15 М фосфатного буфера (рН 6,8) и разрушают одним из трех способов: 1) растиранием замороженных клеток в фарфоровой ступке с кварцевым песком; 2) облучением в УЗДН-1 (излучатель 35 кГц, в течение 15 мин); встряхиванием в гомогенизаторе Л-17. Полученные дезинтеграты центрифугируют при 700 g. Осадок отбрасывают, бесклеточные экстракты используют для определения активности внутриклеточной инвертазы. Активность выражают в единицах на 1 г сухого мицелия или на 1 мг белка. В инкубационную смесь вносят такое количество ферментного препарата, чтобы расщеплению подверглось не более 5% содержащейся в растворе сахарозы. При выполнении этого условия скорость реакции прямо пропорциональна времени и концентрации фермента.

Последовательность определения. 1 мл фильтрата культуральной жидкости, 0,5 мл бесклеточного экстракта или раствора фермента отбирают в две мерные колбы емкостью 100 мл. Прибавляют по 5 мл 0,5 М раствора KH₂PO₄ и по 10 мл 2%-ного раствора сахарозы. Одну колбу (контрольную) кипятят в течение 1 мин. После чего в обе колбы добавляют по 3 капли толуола и ставят в термостат при температуре 40° С на 2 ч [368]. После инкубации колбу с опытным раствором кипятят 1 мин, затем охлаждают и в обе колбы для депротеинизации добавляют по 2 мл 10%-ного раствора ZnSO₄ и 1 мл 0,4 н. раствора NaOH.

Разбавляют водой до метки, взбалтывают и фильтруют через сухой фильтр в сухую колбу.

Существуют и другие варианты реакционной смеси: сахароза (50 мкмоль), ацетатный буфер рН 5,0 (10 мкмоль), ферментный препарат (разведение подбирают). Инкубируют 15 мин при 38° С. Реакцию останавливают, добавляя 0,5 мл 0,2 н. HClO_4 , и смесь нейтрализуют, добавляя 0,5 мл 0,2 н. KOH [699].

Сумму сахаров, накопившихся в реакционной смеси после инкубации с ферментным препаратом, обычно определяют одним из методов йодометрического титрования, в частности методом Шомодьи — Нельсона [777] или одной из его модификаций [368]. Для этой цели по 10 мл реакционной смеси переносят в колбы на 100 мл, добавляют по 10 мл меднощелочного реактива, перемешивают, накрывают колбы воронками и кипятят на водяной бане. При этом оксид двухвалентной меди восстанавливается до оксида одновалентной меди, который окисляется затем свободным йодом. Необходимыми условиями протекания реакции окисления являются некоторый избыток йода и слабокислая среда (рН 5). Через 15 мин колбы охлаждают и постепенно при взбалтывании прибавляют по 5 мл смеси щавелевой и серной кислот. После полного растворения оксида меди остаток йода титруют 0,01 н. раствором тиосульфата в присутствии 0,5 мл 0,5%-ного раствора крахмала. Отдельно титруют 10 мл меднощелочного реактива с 5 мл смеси щавелевой и серной кислот. Активность фермента рассчитывают по формуле

$$A = \frac{Y \{ [248 - (a - x)] (a - x) - [248 - (a - y)] (a - y) \}}{cpt \cdot 1000},$$

где A — активность сахаразы (выражена количеством инвертного сахара (мг), продуцируемого за 1 ч 1 г мицелия или 1 мл культуральной жидкости); a — количество 0,01 н. раствора тиосульфата, затраченное при титровании 10 мл меднощелочного реактива (мл); x , y — соответственно количество 0,01 н. раствора тиосульфата, затраченное на титрование опытного и контрольного растворов (мл); Y — объем колбы, в которой производится инкубация (мл); c — количество раствора, взятое для определения сахаров (мл); p — навеска мицелия (г) или количество культуральной жидкости (мл), взятое для определения; t — время действия фермента (ч) [368, 777].

Активность инвертазы в щелочной среде определяют с помощью реактива Тульчинского перманганатным методом Бертрана [433]. К 6 мл полученного фильтрата добавляют 6 мл 0,1 н. K_2CrO_4 . Реакцию окисления сахаров проводят на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Затем пробирки охлаждают до комнатной температуры. Окраска раствора с реактивом Тульчинского меняется от желтой до зеленой. Колориметрирование проводят на ФЭКе при 610 нм. Стандартную кривую строят после гидролиза сахарозы HCl . Активность фермента выражают количеством микромолей сахарозы, прогидролизованной данным количеством фермента за 1 мин. Активность инвертазы определяют также одним из методов, основанных на применении глюкозооксидазы для количественного определения образуемой глюкозы. К ним относятся методы, в которых в качестве хромогенных акцепторов кислорода используют *o*-толидин, *o*-дианизидин (см. раздел V.4). Удобна модификация глюкозооксидазного метода с использованием 0,1%-ного раствора ферроцианида калия (желтой кровяной соли). Раствор готовят в день определения или накануне. Хранят в темной склянке на холоду. Другие реактивы: 0,4 М фосфатный буфер (рН 7,5), глюкозооксидаза и пероксидаза. Для приготовления рабочего реактива 2,5 мг

глюкозооксидазы и 1,5 мг препарата пероксидазы растворяют в 16,6 мл 0,4 М раствора фосфатного буфера, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл и доводят до метки 0,1%-ным раствором ферроцианида калия. К 0,2 мл исследуемого раствора, содержащего 10—150 мкг глюкозы, прибавляют 3 мл рабочего реактива и оставляют при комнатной температуре. После развития лимонно-желтой окраски оптическую плотность измеряют на спектрофотометре или ФЭКе при 410 нм против контроля (0,2 мл воды и 3 мл рабочего реактива). Количество глюкозы в исследуемом растворе определяют по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят растворы, содержащие 100 — 750 мкг глюкозы в 1 мл, что соответствует 20—150 мкг в пробе [476].

Для определения активности β -фруктофуранозидазы в качестве специфического субстрата используют раффинозу [132].

V.7.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ САХАРОЗОФОСФОРИЛАЗЫ (САХАРОЗОГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ)

Состав инкубационной смеси: 0,14 М раствор сахарозы в 0,06 М фосфатном буфере (рН 7,0), 10%-ный раствор ферментного препарата и 0,05 М раствор NaF [3]. Время инкубации 2—48 ч в зависимости от степени ферментативной активности. Реакцию останавливают добавлением ТХУ. Контролем служат пробы, обработанные ТХУ до инкубации. После фильтрации в пробах определяют неорганический фосфор. Для этого в колбу с 20 мл 10%-ного раствора ТХУ вливают 5 мл испытуемой жидкости, перемешивают и немедленно фильтруют. В мерные пробирки на 10 мл к 3 мл фильтрата добавляют 5 мл стандартного фосфатного раствора, приливают при энергичном встряхивании по 1 мл 2,5%-ного молибденовокислого аммония в 3 н. H_2SO_4 , затем по 0,4 мл раствора эйконогена, хорошо взбалтывают, доливают до метки и снова перемешивают. Выдерживают на водяной бане при 37° С 3 мин, охлаждают и затем колориметрируют при 720 нм с красным светофильтром. Для приготовления стандартного раствора фосфора 0,3513 г KH_2PO_4 растворяют в 1 л воды в присутствии 20 мл 0,1 н. H_2SO_4 . Исходный раствор разбавляют в 10 раз кислотой. В 5 мл разбавленного раствора содержится 0,04 мл фосфора. Эйконоген растворяют в 125 мл смеси, состоящей из 59,5 г $NaHSO_3$ и 2 г безводного Na_2SO_3 в 250 мл дистиллированной воды, и доводят водой до 200 мл. Раствор эйконогена может храниться в склянке с притертой пробкой до 2 нед. Активность фермента выражают количеством фосфора (мг), освободившегося под действием фермента за единицу времени.

Если гидролиз сахарозы происходит в присутствии акцептора фруктозного остатка, инвертаза обнаруживает трансферазное действие [338].

V.7.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕКСТРАНСАХАРАЗЫ И АМИЛОСАХАРАЗЫ

Этот фермент образует декстраны из глюкозных единиц, освобождающихся при расщеплении сахарозы, перенося их на растущие декстрановые цепи.

Состав реакционной смеси для определения декстрансахаразы (сахарозо-6-глюкозилтрансферазы): 100 мг клеток, 20 мл 300 мкМ раствора сахарозы и ацетатный буфер (рН 5,0). Инкубацию проводят при температуре 25° С. Учет активности декстрансахаразы осуществляют по количеству освободившейся фруктозы, которое эквивалентно

количеству глюкозных единиц, вошедших в декстран. Для определения количества *D*-фруктозы используют различные реакции на кетосахара, в частности антроновый метод [443], основанный на том, что сахара в сильноокислой среде образуют фурфурольные производные сине-зеленой окраски. Антроновый реактив готовят так: 0,05 г антрона растворяют в 100 мл 66%-ной (по объему) хч H_2SO_4 при нагревании на водяной бане, затем раствор быстро охлаждают. В большие пробирки из термостойкого стекла размером 20 × 200 мм вносят по 1 мл испытуемого раствора, содержащего 25—125 мкг сахара и добавляют по 10 мл свежеприготовленного раствора антрона. Нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. Растворы охлаждают и через 5 мин колориметрируют.

Следует отметить, что растворы глюкозы, фруктозы и других сахаров одинаковой концентрации дают при реакции с антроном равноценные изменения оптической плотности, измеряемые на ФЭКе при 630 нм с красным светофильтром. Поэтому для всех сахаров используется одна калибровочная кривая, составленная по глюкозе с концентрацией 5—12 мг%. С помощью антронового метода можно определять содержание сахаров с точностью 0,5—1,0%. За единицу активности декстрансахаразы принимают количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль фруктозы за 1 мин. Принцип определения активности амилосахаразы (сахарозо-4-глюкозилтрансферазы) аналогичен.

V.7.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛЕВАНСАХАРАЗЫ И ИНУЛАЗЫ

Состав реакционной смеси для определения активности левансахаразы (сахарозо-6-фруктозилтрансферазы; К.Ф.2.4.1.10) : 1—2 мл исследуемой пробы и 1 мл раствора сахарозы в 0,2 М фосфатном буфере (рН 5,3). Инкубацию проводят при 30° С в течение 30 или 120 мин в зависимости от степени левансахаразной активности культуральной жидкости или бесклеточного экстракта.

В процессе синтеза левана увеличивается оптическая плотность реакционной смеси. Причем количество синтезированного левана пропорционально оптической плотности реакционной смеси, как пропорционально ей и количество глюкозы, освобождающейся из сахарозы в ходе левансахаразной реакции. Это совпадение позволяет оценивать активность левансахаразы по изменению оптической плотности реакционной смеси в результате инкубации, а активность ее выражать в микромолях глюкозы [484]. Для определения глюкозы используют глюкозооксидазный метод. За единицу активности левансахаразы принимают количество фермента, содержащееся в 1 мл культуральной жидкости или в 1 мг сухого мицелия, которое катализирует образование 1 мкмоль глюкозы за 1 мин.

Активность инулазы (сахарозо-1-фруктозилтрансферазы; К.Ф.2.4.1.9) определяют по такому же принципу [433].

V.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НУКЛЕАЗ

V.8.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Высокая биохимическая активность грибов связана с выработанным в процессе эволюции у них и ряда сапрофитных бактерий «внешним» пищеварением или осмотротфным питанием [163], которое невоз-

можно без секреции пищеварительных гидролитических ферментов в окружающую среду. Класс гидролаз включает *фосфогидролазы*, к которым по классификации ферментов 1972 г. относятся и РНКазы.

Все ферменты, участвующие в расщеплении НК, называются нуклеазами. Они включают ферменты, специфичные для ДНК (ДНКазы) и РНК (РНКазы), и большую группу ферментов, способных расщеплять оба типа молекул НК,— нуклеазы [23, 24]. По механизму действия нуклеазы подразделяют на две группы: фосфотрансферазы и фосфогидролазы.

Фосфотрансферазы используют 2'-ОН группу рибозы для расщепления фосфодиэфирной связи, в результате чего образуются циклические 2',3'-дифосфаты, которые затем гидролизуются до соответствующих нуклеозид-3'-монофосфатов. К ним относятся только истинные (циклизирующие) РНКазы.

Фосфогидролазы в отличие от фосфотрансфераз катализируют прямое расщепление 3', 5'-фосфодиэфирной связи водой. К ним относятся ферменты, обладающие и не обладающие специфичностью к углеводу в НК: ДНКазы, РНКазы-гидролазы и неспецифичные нуклеазы. Истинные РНКазы являются эндонуклеазами, т. е. расщепляют внутренние фосфодиэфирные связи в РНК. Отличительной чертой их является также то, что они не нуждаются в ионах двухвалентных металлов в качестве активаторов. РНКазы проявляют более или менее выраженную специфичность к основаниям, примыкающим к разрываемой фосфодиэфирной связи. На основании этого их делят на три основные группы:

1) *пиримидинспецифичные РНКазы* (К.Ф.3.1.4.22) (рекомендуемое классификацией 1972 г. рабочее название — «рибонуклеаза I»);

2) *гуанинспецифичные РНКазы* (К.Ф.3.1.4.8) (рекомендуемое классификацией 1972 г. название — «гуанилорибонуклеаза»; систематическое название — «рибонуклеат-3'-гуанилолигонуклеотидогидролаза»);

3) *неспецифичные РНКазы* (К.Ф.3.1.4.23) (рекомендуемое классификацией 1972 г. название — «рибонуклеаза II»; систематическое название — «рибонуклеат-3'-олигонуклеотидогидролаза»).

Грибы образуют и выделяют в окружающую среду кислые — неспецифичные и щелочные — высокоспецифичные РНКазы. Касаясь таксономического положения грибов — продуцентов РНКаз, нужно подчеркнуть, что способность продуцировать гуанинспецифичные РНКазы с низкой молекулярной массой присуща зигомицетам, аскомицетам, несовершенным грибам и базидиомицетам. Кислые РНКазы образуют не только истинные грибы, но и миксомицеты [21, 25].

Фосфогидролазы подразделяют на экзонуклеазы, расщепляющие субстраты с концов полинуклеотидных цепей, и эндонуклеазы, разрывающие внутренние межинуклеотидные связи [23]. Эти две группы ферментов включают РНКазы-гидролазы, специфичные к РНК, ДНКазы и собственно нуклеазы. По современной классификации ферментов нуклеазы отнесены к следующим систематическим группам:

1. *Фосфогидролазы ортофосфатных дифосфатов* (К.Ф.3.1.4.1) — экзонуклеазы, специфичные и неспецифичные к углеводу в НК.

2. *Олигонуклеотидгидролазы дезоксирибонуклеиновых кислот* (К.Ф.3.1.4.5; К.Ф.3.1.4.6) — ДНКазы-эндонуклеазы.

3. *Эндонуклеазы* (К.Ф.3.1.4.7; К.Ф.3.1.4.9) включают неспецифичные к углеводу нуклеазы и РНКазы-гидролазы, осуществляющие внутрицепочечное расщепление НК.

V.8.2. СРЕДЫ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ НУКЛЕАЗ

Среды для поверхностного культивирования (время культивирования 1—2 нед. при температуре 24° С):

Агаризованная среда Чапека

Состав	%	Состав	%
Сахароза	3,0	KCl	0,05
NaNO ₃	0,2	FeSO ₄	0,001
KH ₂ PO ₄	0,1	Агар-агар	1,5—2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05		

«Косячки» желательно хранить при 4° С.

Среды для глубинного культивирования грибов:

Состав	Среда Огата, %	Видоизменен- ная среда [23], %
Глюкоза	5,0	5,0
Пептон	0,5	1,0
Соевая мука	0,5	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	0,05
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01	0,01
KNO ₃	0,2	0,2
Бычий экстракт	0,5	—
Дрожжевой экстракт	0,2	—

pH среды до стерилизации должен быть около 6,2; после стерилизации — 5,7—5,9. Стерилизацию проводят 30 мин при давлении 0,5 атм. Видоизмененная среда Огата по своему составу в основном отвечает потребностям большинства сапрофитных грибов. Она не содержит минерального фосфата, что очень существенно для синтеза и секреции ферментов катаболизма НК [148, 531, 613].

Дрожжи можно выращивать на свободной от ортофосфата среде, содержащей 2,5% глюкозы, 0,1 мочевины и 0,5% освобожденного от ортофосфата дрожжевого экстракта [531].

Помимо жидких питательных сред для глубинного культивирования при поиске продуцентов нуклеаз все еще используют твердые среды. Так, рекомендуют [591] культивировать грибы рода *Penicillium* на влажных пшеничных отрубях (8 г отрубей увлажняют 5 мл воды) при 28° С 2 дня и затем при 20° еще 3 дня. Активность нуклеаз измеряют в водном экстракте полученного материала после концентрирования его высаливанием сульфатом аммония и диализа.

При отборе культур, обладающих способностью гидролизовать РНК, также используют твердые питательные среды. В ряде случаев они отличаются от жидких сред лишь тем, что в их состав введена РНК или рибонуклеат натрия (РНК-Na) (0,4%) и агар (1,5—2,0%).

После выращивания соответствующих культур в термостате на поверхность агара в чашках Петри наносят 1 н. раствор HCl для осаждения нерасщепленной РНК. Зоны просветления вокруг областей роста колоний указывают на гидролиз РНК. Аналогичные данные могут быть получены с введением в состав сред ДНК.

Некоторые грибы продуцируют внеклеточные ДНКазы при росте на видоизмененной среде Огата [367], состав которой приведен выше.

V.8.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РИБОНУКЛЕАЗ

Активность РНКаз определяют спектрофотометрическим методом, используя в качестве субстрата натриевую соль дрожжевой РНК, приготовленную следующим образом: дрожжевую РНК (Олайнский завод) растворяют в 0,5 н. растворе NaOH ($\text{pH} < 8$), диализуют в целлофановом мешочке против дистиллированной воды (2 сут) и 0,01 М раствора ЭДТА (1 сут), затем осаждают 2,5 объемами этанола после добавления 0,1 объема 20%-ного раствора ацетата натрия. После отстаивания в течение суток на холоду осадок отделяют фильтрованием под вакуумом, промывают холодным этанолом и диэтиловым эфиром, высушивают в вакуум-эксикаторе и растирают в ступке. Хранят РНК-На в плотно закрытой склянке при 4°C .

Для определения активности РНКаз реакционную смесь, содержащую 0,5 мл водного раствора РНК-На (8 мг/мл), 0,4 мл 0,2 М буфера (соответствующего pH, например, 7,9) или 0,2 М ацетатного буфера (pH 5,0) и 0,4 мл раствора фермента, инкубируют в течение 25 мин при 25°C . Реакцию останавливают добавлением 0,5 мл 0,75%-ного раствора уранилацетата в 25%-ной хлорной кислоте и доводят объем до 3,0 мл водой. После 30-минутного отстаивания при 4°C осадок удаляют фильтрованием. 0,1 мл фильтрата вносят в 3 мл дистиллированной воды и измеряют светопоглощение при 260 нм. В контрольную пробу раствор фермента вносят после добавления уранилацетата.

За единицу активности РНКазы принимают ее количество, которое вызывает увеличение светопоглощения при 260 нм (ΔA_{260}) на 1,0 при описанных условиях определения. Если величина ΔA_{260} превышает 0,200—0,250, то определение активности повторяют с большим разведением фермента. Активность РНКазы (ед./мл) рассчитывают с учетом количества фермента, взятого на определение (0,4 мл), и его исходного разведения, не принимая во внимание все последующие разведения фермента в процессе определения активности.

V.8.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НУКЛЕАЗ, ВКЛЮЧАЯ ДНКазы

Активность ДНКаз и нуклеаз может быть определена приведенным выше методом, но с использованием ДНК в качестве субстрата, а также с введением в реакционную смесь катионов двухвалентных металлов, чаще всего Mg^{2+} , при соответствующих значениях pH, так как большинство нуклеаз имеют оптимальную активность как в кислой, так и в слабощелочной среде (табл. 13) и являются металлозависимыми белками.

ДНК обычно растворяют в слабом растворе соли (например, 0,03 М NaCl). Для получения раствора денатурированной ДНК его нагревают при 100°C 10—15 мин и быстро охлаждают на ледяной бане. Реакционную смесь обычно инкубируют при 37°C 15, 30 или 60 мин. Нерасщепленный субстрат осаждают раствором уранилацетата в хлорной кислоте (HClO_4) в указанных выше концентрациях или 0,25%-ным уранилацетатом в 2,5%-ной хлорной кислоте, или только хлорной кислотой. После выдержки на холоду (от 15 мин до 1 ч) осадок удаляют центрифугированием или фильтрованием и после соответствующего разведения фильтрата или центрифугата дистиллированной водой измеряют его светопоглощение при 260 нм.

Т а б л и ц а 13. Некоторые свойства нуклеаз грибов [23]

Фермент	Продуцент	Оптимум рН	Активаторы
Нуклеаза S ₁	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,0—4,6	Zn ²⁺ , Co ²⁺
Нуклеаза О	<i>A. oryzae</i>	7,7—8,2	Mg ²⁺ (0,1 мкМ), Mn ²⁺
ДНКаза К ₁	<i>A. oryzae</i>	8,5—9,5	Mg ²⁺
ДНКаза К ₂	<i>A. oryzae</i>	8,0	Mn ²⁺ (1 мкМ РНК и 0,1 мкМ ДНК)
ДНКаза *	<i>A. oryzae</i>	8,2	Co ²⁺ , Mg ²⁺ и Mn ²⁺
5'-Нуклеаза	<i>A. quercinus</i>	8,5—8,8	
Нуклеаза	<i>Penicillium citrinum</i>	4,5—6,2	Zn ²⁺ , Ca ²⁺
РНКаза Е-III	<i>Phoma cucurbitacearum</i>	5,5	Mg ²⁺ , Ca ²⁺
ДНКаза	<i>Rhizopus sp.</i>	7,8—8,0	Mg ²⁺ , Mn ²⁺

* [758].

В качестве примера ниже приведены два способа определения активности нуклеазы *Acrocylindrium sp.* [786].

1. Состав реакционной смеси (0,4 мл): 2 мг высокомолекулярной дрожжевой РНК; 2 мкмоль MnCl₂, 50 мкмоль Трис-НСl буфера (рН 7,5) и 0,55 — 1,1 мкг эндонуклеазы. Инкубация в течение 15 мин при 37° С. Реакцию прекращают добавлением 0,4 мл охлажденной 10%-ной хлорной кислоты. После 20 мин выдерживания при 0° С осадок удаляют центрифугированием в течение 5 мин при 4000 g. 0,1 мл центрифугата разводят до 4,0 мл дистиллированной водой и измеряют абсорбцию при 260 нм в спектрофотометре по отношению к контролю без фермента.

2. Состав реакционной смеси (0,4 мл): 600 мкг ДНК; 2 мкмоль MnCl₂; 20 мкмоль Трис-НСl буфера (рН 8,0) и 0,022 мкг эндонуклеазы. Инкубация в течение 15 мин при 37° С. Реакцию прекращают добавлением 0,4 мл холодной 10%-ной хлорной кислоты. После 20 мин выдерживания при 0° С осадок удаляют центрифугированием при 7700 g; 0,2 мл центрифугата разводят дистиллированной водой до 4,0 мл и измеряют абсорбцию при 260 нм против контроля. Активность выражают в ΔA₂₆₀.

Если в исследуемом растворе присутствуют РНКазы и нуклеазы и в качестве субстрата используют РНК, для подавления активности нуклеаз в реакционную смесь вводят ЭДТА, являющийся ингибитором металлозависимых ферментов.

У.8.4.1. НЕФЕЛОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕАЗ

Помимо различных модификаций спектрофотометрических методов определения активности нуклеаз имеются и нефелометрические методы, преимущество которых заключается в использовании более простого оборудования.

Данный метод характеризуется тем, что после инкубации реакционной смеси при 37° С реакцию прекращают добавлением равного объе-

ма 1 н. HCl, мутность измеряют в нефелометре (ФЭК-Н) с зеленым светофильтром и сравнивают с контролем. Активность фермента выражают в единицах оптической плотности. Ниже приведен один из примеров.

Состав реакционной смеси: 0,25 мл раствора ДНК тимуса (2 мг/мл); 1,0 мл 0,1 М буфера соответствующего рН; 0,5 мл 0,03 М $MgCl_2$; 0,65 мл дистиллированной воды и 0,1 мл исследуемого раствора. Смесь выдерживают в термостате при 37° С в течение 30 мин. Затем прибавляют 2,5 мл 1 н. HCl, перемешивают и измеряют оптическую плотность.

В контрольную пробу исследуемый раствор вносят после раствора соляной кислоты. Под действием фермента оптическая плотность взвеси уменьшается. За единицу активности часто принимают изменение оптической плотности на 0,1 в указанных условиях определения [367].

V.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ

V.9.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГРИБОВ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ОТБОРЕ

С целью изыскания штаммов — продуцентов ферментов — необходимо проводить первичный отбор микроорганизмов. Для первичного отбора продуцентов протеиназ грибы культивируют на различных средах: 10- и 5%-ном водном и мясо-пептонном желатине (кислая и нейтральная среды), обезжиренном молоке, яичном альбумине, кровяном агаре и др.

V.9.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛАТИНАЗНЫХ СВОЙСТВ

Желатин разливают в пробирки по 3—5 мл (строго придерживаясь выбранной дозы) и стерилизуют сухим паром. Для определения изменения рН в процессе роста микроорганизма в желатин добавляют индикатор — бромтимоловый синий (0,1%-ный раствор). В кислой среде желатин окрашивается в желтый цвет, в щелочной — в синий.

1. Посев культуры гриба из пробирок со скошенным агаром на желатиновые среды осуществляют уколом петли. Среда ставят в термостат с определенной температурой. Через определенные промежутки времени (1, 2 и т. д. суток) пробирки со средой ставят в холодильник для застывания желатина. Спустя 1 ч, пробирки вынимают, слегка встряхивают. Если микроорганизм продуцирует протеолитические ферменты, то столбик желатина разжижается. По количеству разжиженного желатина (выраженному в миллиметрах столбика желатина) судят о наличии протеолитических ферментов и их относительной активности. Например, через 1 сут после посева один штамм гриба разжижает 5 мм столбика желатина (весь столбик желатина в пробирке равен 30 или 50 мм), а другой за это же время — 15 мм; очевидно, что второй штамм обладает более активным комплексом протеолитических ферментов.

2. В качестве субстрата используют обычную фотопленку или РФ-3. Пленку засвечивают, проявляют и закрепляют. В пробирки наливают по 3—5 мл фильтрата культуральной жидкости или вытяжки из мицелия, помещают в каждую пробирку полоску разрезанной пленки

(0,5 × 2 см) и ставят в термостат при 30—35° С. Через определенные промежутки времени (часы, сутки) учитывают степень гидролиза слоя эмульсии и определяют время, за которое пленка становится прозрачной. В случае высокой протеолитической активности культуральной жидкости пленка может стать прозрачной уже через 20—30 мин.

V.9.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Обезжиренное или сепарированное молоко (цельное молоко центрифугируют 1 ч со скоростью 3000 об/мин) разливают в пробирки по 5 мл, стерилизуют при давлении 0,5 атм в течение 20—30 мин. Затем испытуемые грибы пересевают с сусло-агаровых косяков в пробирки с молоком и ставят в термостат при определенной температуре. Учет результатов проводят через 1, 2 и т.д. сут. При этом может наблюдаться свертывание молока или его пептонизация, либо сначала пептонизация, а затем свертывание. При свертывании образуется сгусток, а при пептонизации молоко становится прозрачным. Иногда оба процесса происходят одновременно. Активность казеинолитических ферментов определяют по степени свертывания или пептонизации и по скорости этих процессов, т. е. по времени.

V.9.1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Состав среды (г): 1 л дистиллированной воды; 1 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄; 0,5 KCl; 0,01 FeSO₄, два взбитых яичных белка. Полученную таким образом жидкую (мутную) белковую среду разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют текучим паром. Посев грибов производят так же, как при определении казеинолитических свойств грибов. Пробирки помещают в термостат с определенной температурой и через 1, 2 и т.д. суток определяют альбуминазную активность по степени просветления столбика белковой среды в пробирке и скорости этого процесса. Вместо жидкой среды употребляют агаризованную, и по наличию и размерам зон просветления вокруг растущей колонии гриба определяют присутствие ферментов.

V.9.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Существует несколько методов выявления у грибов ферментов, вызывающих гемолиз крови и растворение тромбов. Ниже приведены некоторые из них.

1. Стерильно взятую кровь (из вены кролика) разливают в бутылочки (колбочки), на дне которых находятся стеклянные бусинки. Кровь с бусинками тщательно взбалтывают 20—30 мин для дефибрикации. К 100 мл стерильного суслового агара, нагретого до 45° С, приливают 5 мл дефибринизированной крови, перемешивают и разливают по 10 мл в чашки Петри. Перед началом опыта чашки Петри с кровяным агаром ставят на сутки в термостат при 37° С, чтобы определить ее стерильность. Чашку Петри засевают испытуемыми культурами грибов. О наличии гемолитических свойств у микроорганизмов судят по величине зоны гемолиза — зоны просветления кровяного агара (в миллиметрах).

2. Культуральную жидкость после культивирования грибов при определенных условиях вливают (по 0,1—0,2 мл) в специальные металлические или стеклянные цилиндрики, установленные в застывшем кровяном агаре в чашках Петри. Чашки выдерживают в термостате

1—4 сут при различной температуре. Появление вокруг цилиндриков зон просветления указывает на способность фильтрата вызывать гемолиз.

V.9.1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

1. В пробирки наливают 1 объем цитратной крови (к 20 мл крови прибавляют 16 мг лимоннокислого натрия для предотвращения свертывания) и 1 объем тромбина; при этом возникают плотные цилиндрической формы тромбы диаметром 8 мм и длиной 15 мм (размеры тромба зависят от количества крови и тромбина в пробирке). К тромбам приливают культуральную жидкость (2—3 мл), выдерживают в термостате при 30—37° С. О фибринолитической активности судят по скорости растворения тромба.

2. Фибринолитическую активность грибов можно определять методом пластин. В колбе Эрленмейера емкостью 50 мл смешивают 10 мл 0,3%-ного раствора фибриногена и 0,3 мл 1%-ного раствора тромбина (приготовленные на физиологическом растворе). Смесь фибриногена и тромбина быстро вливают в стерильные чашки Петри диаметром 10 см. Под влиянием тромбина фибриноген превращается в нерастворимый гельфибрин, на поверхность которого микропипеткой наносят по 0,03 мл культуральной жидкости. На каждой чашке можно сделать три-четыре определения. Пленки инкубируют при 38° С; время инкубации различно. Фибринолитическую активность оценивают по величине зоны лизиса фибрина и выражают в условных единицах на 1 мл культуральной жидкости (1 условная единица соответствует зоне лизиса в 10 мм).

V.9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ [334]

Определенное количество обезжиренного молока (например, 100 мл) гомогенизируют с 50 мл 0,02 М CaCl_2 , выдерживают при температуре 25 или 37° С, доводят рН до 6,1. В стандартные пробирки с 10 мл молока добавляют 1—2 мл культуральной жидкости или раствора фермента, перемешивают и ставят в ультратермостат или водяную баню при указанных температурах. Отмечают по секундомеру время внесения фермента или культуральной жидкости и время начала свертывания молока, которое определяют по возникновению молочных сгустков на стенках пробирок при встряхивании. Активность фермента выражают в секундах.

V.9.3. ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕАЗ [32]

Метод основан на уменьшении вязкости растворов белков под действием ферментов. Раствор какого-либо белка достаточно вязкой консистенции (обычно 1—2%-ный раствор желатина) наливают в вискозиметр Оствальда и помещают в водяной термостат при температуре 30° С. Через 10 мин, когда раствор желатина приобретет данную температуру, измеряют его вязкость. Затем к раствору добавляют исследуемый ферментный препарат и через определенные промежутки времени (3—5—7 мин и т. д.) измеряют вязкость раствора. Чем активнее фермент, тем быстрее уменьшается вязкость. Активность ферментного препарата выражают в секундах.

V.9.4. МЕТОД ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ [32]

В результате ферментативного гидролиза белков протеолитическими ферментами разрушаются пептидные связи с освобождением эквивалентных количеств аммиака и карбоксильных групп, которые учитывают разными способами. Однако определение аммиака и карбоксильных групп в амфотерных электролитах, т. е. аминокислотах, полипептидах, сопряжено с большими трудностями, так как свободные аммиачные группы, обладающие щелочными свойствами, нейтрализуются в водной среде свободными карбоксильными группами, имеющими кислый характер. Для предотвращения этого процесса в водные растворы аминокислот вводят раствор формалина, который связывает аминные группы; карбоксильные группы оттитровывают щелочью и косвенным путем определяют количество аминных групп.

Степень гидролиза определяют по разности между количеством щелочи, затраченным на титрование до и после гидролиза. Концентрация водородных ионов, при которой карбоксильные группы полностью нейтрализуются щелочью, находится в пределах pH 9—9,5 при интенсивно красном окрашивании по фенолфталеину.

Реактивы: 0,5%-ный раствор фенолфталеина в 50%-ном растворе спирта; 0,2 н. раствор NaOH; свежеприготовленный раствор формольной смеси (к 50 мл 40%-ного (промышленного) формалина прибавляют 2 мл 0,5%-ного раствора фенолфталеина и нейтрализуют 0,2 н. NaOH до слабо-розового цвета).

Последовательность определения. К определенному количеству гидролизата белка или разжиженного под действием протеолитических ферментов желатина (например, 5 мл) прибавляют две капли фенолфталеина и оттитровывают 0,2 н. NaOH до слабо-розовой окраски. Контролем служит такое же количество дистиллированной воды (свободной от CO₂) или же раствор белка, не подвергавшийся действию фермента. Затем к растворам прибавляют 2,5 мл формольной смеси и титруют 0,2 н. раствором NaOH до ярко-красной окраски. Из количества щелочи, затраченной на титрование опытной пробы, вычитают количество щелочи, затраченной на титрование контроля.

Расчет: 1 мл 0,2 н. раствора NaOH, использованного на титрование, соответствует 2,8 мг N. Содержание аминного азота в растворе определяют, умножая количество затраченного на титрование 0,2 н. раствора NaOH (в миллилитрах) на 2,8.

V.9.5. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ ПО ПРИРОСТУ АМИННОГО АЗОТА [32, 371]

Метод основан на йодометрическом определении способности аминокислот и различных пептидов образовывать комплексные растворимые соединения с медью.

К определенному количеству испытуемого раствора (например, ферментного гидролизата), содержащего смесь аминокислот и пептидов (при слабощелочной реакции), прибавляют в избытке суспензию фосфата меди в боратном буфере. В результате после взбалтывания медные соли большинства аминокислот переходят в раствор. Избыток фосфата меди отфильтровывают, в прозрачный раствор добавляют уксусную кислоту и определяют медь йодометрическим способом.

Реактивы: 1) раствор хлорной меди (27,3 г на 1 л H₂O); 2) трехзамещенный фосфат натрия (64,5 г Na₂HPO₄ растворяют в 50 мл дистил-

лированной воды без CO_2 , добавляют 7,2 н. NaOH ; после растворения доводят объем раствора до 1 л водой); 3) боратный буфер (5,7 г буры $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ — натрий тетраборнокислый) растворяют в 150 мл воды, прибавляют 10 мл 1 н. раствора HCl и доводят объем раствора до 200 мл; 4) суспензия фосфорнокислой меди (один объем реактива 1 добавляют к двум объемам реактива 2, перемешивают и приливают два объема реактива 3); 5) раствор 0,25 г тимолфталейна в 100 мл 50%-ного этилового спирта; 6) 80%-ная уксусная кислота; 7) свежеприготовленный раствор 0,01 н. раствора гипосульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$); 8) 0,5 н. раствор NaOH .

Последовательность определения. 1—2 мл ферментного гидролизата помещают в колбу емкостью 25 мл, нейтрализуют 0,5 н. раствором NaOH по тимолфталейну до слабо-голубого окрашивания. В колбу добавляют 10—12 мл смеси, состоящей из взвешенного осадка фосфата меди (реактив 4), объем раствора доводят водой до метки, встряхивают и центрифугируют или фильтруют через плотный фильтр. 10—15 мл отфильтрованного раствора переносят в колбу, подкисляют 0,25—0,5 мл 80%-ной уксусной кислоты, добавляют 0,2—0,4 г KCl и титруют выделившийся йод 0,01 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, добавляя к концу титрования 2—4 капли раствора 0,1%-ного крахмала до исчезновения синей окраски.

Расчет: количество 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, использованного на титрование, умножают на 0,28. Результат соответствует содержанию аминного азота во взятой пробе (в миллиграммах).

V.9.6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ [275, 334, 375, 380]

Метод основан на способности белковых субстратов и продуктов их ферментативного расщепления поглощать свет в ультрафиолетовой части спектра. Поглощение света обусловлено наличием ароматических аминокислот, в основном тирозина и в меньшей степени триптофана, причем максимум поглощения наблюдается при длине волны 275—280 нм. В качестве субстрата для действия ферментов обычно используют казеин или гемоглобин.

Приготовление гемоглобина. В сосуд с бычьей кровью прибавляют раствор цитрата натрия (3 г на 1 л крови) для предотвращения ее свертывания. Кровь перемешивают и центрифугируют. Плазму крови и белые кровяные тельца, которые образуют тонкий слой на поверхности, удаляют сифонированием. Эритроциты смешивают с равным объемом охлажденного 1%-ного раствора NaCl и вновь центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок взбалтывают и диализируют в целлофановых мешочках против дистиллированной воды на холоду. После 24-часового диализа содержимое всех мешочков смешивают и хранят гемоглобин в замороженном состоянии. Для определения обычно берут 2,5%-ный раствор гемоглобина.

Приготовление раствора казеина. Навеску казеина по Гаммарстону суспендируют в 0,1 М цитрат-фосфатном буфере (рН 8) и выдерживают на водяной бане при температуре 60—70° С 40 мин (до полного растворения казеина). Затем 0,05 М раствором лимонной кислоты доводят рН растворов до нужного уровня. Раствор казеина можно хранить на холоду в течение недели. Для определения используют обычно 1%-ный раствор казеина.

Последовательность определения. В пробирки вливают по 1 мл цитрат-фосфатного буфера, 1 мл исследуемой культуральной жидкости или раствора фермента и помещают их в термостат при определенной температуре на 5—10 мин для нагревания до данной температуры. Затем в смесь прибавляют 1 мл субстрата (гемоглобина или казеина), перемешивают и инкубируют. Реакцию останавливают прибавлением равного объема ТХУ. Контрольный опыт готовят так же, только перед внесением раствора субстрата к реакционной смеси прибавляют 10%-ный раствор ТХУ. Растворы фильтруют, и на спектрофотометре определяют в фильтрате количество неосажденных ТХУ продуктов реакции. За единицу протеолитической активности принято количество фермента, при котором за 10 мин при 40° С образуются неосаждаемые ТХУ продукты гидролиза субстрата, оптическая плотность которых при 280 нм соответствует оптической плотности 1 мкг/мл тирозина.

При определении количества тирозина пользуются стандартной кривой. Для ее построения готовят ряд разведений тирозина и определяют их оптическую плотность, затем на оси абсцисс откладывают количество тирозина, а на оси ординат — показания прибора.

V.10. ФЕРМЕНТЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

V.10.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Совокупность множества сложных процессов, протекающих в живом организме, состоящих из ряда последовательных биохимических реакций, которые включают превращение белков, НК, углеводов и липидов, представляет собой метаболизм. Метаболические процессы делятся на *катаболические*, обеспечивающие распад органических молекул различной сложности, и *анаболические*, обеспечивающие синтез клеточного вещества и внеклеточных вторичных метаболитов. Их связывает центральный — *амфиболический* — путь обмена веществ, который включает реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Наряду с этим в организме существуют еще *анаплеротические* (возмещающие) пути, функция которых состоит в восполнении отдельных промежуточных метаболитов, расходующихся в циклических процессах [51, 260, 478]. Несмотря на исключительную сложность, все метаболические процессы в организме тесно связаны и взаимообусловлены. Упорядоченность сложных метаболических превращений в клетке достигается благодаря осуществляемым на различных уровнях регуляторным механизмам.

Грибы, как и все живые существа, нуждаются в источниках энергии, поскольку процессы, обеспечивающие синтез основных химических компонентов живой клетки, сопряжены с реакциями, в которых выделяется энергия. В связи с этим процессам углеводного обмена, ответственным за снабжение клетки необходимым пластическим материалом и энергией, отводится в метаболизме центральное место. Знание процессов углеводного обмена позволяет судить о роли отдельных реакций (или пути в целом) в жизнедеятельности клетки, их функциональной значимости на разных этапах ее развития при потреблении различных источников углеродного питания и биосинтеза веществ, многие из которых представляют интерес для народного хозяйства. Изучение процессов углеводного обмена создает предпосылки регулируемого получения этих веществ и управления процессами биосинтеза.

V.10.2. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ

Известно несколько механизмов, с помощью которых грибы осуществляют превращение углеводов. Основные из них следующие:

1. Гликолитический путь, или схема ЭМП.
2. Пентозофосфатный путь, или схема Варбурга-Диккенса-Хорекера.
3. Цикл трикарбоновых кислот, или цикл Кребса.
4. Глиоксилатный цикл.

Ниже приведены характерные ферментативные реакции и метаболические функции этих механизмов.

V.10.2.1. ГЛИКОЛИТИЧЕСКИЙ ПУТЬ [51, 144, 260, 478]

Открытие промежуточных соединений этого пути внесло существенный вклад в развитие биохимии, так как методический подход к их изучению послужил образцом для исследований других метаболических путей. ЭМП до стадии образования пировиноградной кислоты катализируется группой ферментов (рис. 92). Каждая реакция ЭМП легко обратима, за исключением фосфорилирования глюкозы (гексокиназная реакция), фруктозо-6-фосфата (фосфофруктокиназная реакция) и превращения фосфоэнолпирувата в пируват (пируваткиназная реакция). Образующийся в результате фосфофруктокиназной реакции фруктозо-1,6-дифосфат расщепляется альдолазой с образованием смеси из двух молекул триозофосфат-3-фосфоглицеринового альдегида и диоксиацетонфосфата. Данная реакция является ключевой в схеме ЭМП; обнаружение активности альдолазы указывает на функционирование гликолитического пути у исследуемого организма. Образовавшиеся триозофосфаты находятся в динамическом равновесии, каталитически поддерживаемом триозофосфатизомеразой. В дальнейшем каждый из триозофосфатов в несколько этапов превращается в пируват, образуя при этом четыре молекулы АТФ. Эти реакции в отличие от окислительного фосфорилирования называются фосфорилированием на уровне субстрата.

Первую стадию гликолиза можно рассматривать как подготовительный этап. Именно на этой стадии различные гексозы, пентозы, а также глицерин могут вовлекаться в гликолиз, фосфорилируясь за счет АТФ и образуя общий продукт — 3-фосфоглицериновый альдегид. Вторая стадия представляет собой процесс, общий для всех сахаров. Она включает окислительно-восстановительные реакции, сопровождающиеся накоплением энергии. На первой стадии гликолиза расходуется две молекулы АТФ, а на второй — образуется четыре молекулы. Таким образом, в сумме при расщеплении одной молекулы глюкозы синтезируются две молекулы АТФ, и эффективность гликолиза в смысле накопления энергии составляет 50%. Ферментом, регулирующим скорость гликолиза, является фосфофруктокиназа.

В целом, как видно из приведенной схемы, гликолиз представляет собой окислительно-восстановительный распад углеводов с образованием субстратов для последующих превращений, а также кругооборот фосфорной кислоты, сопровождающийся приростом АТФ [260, 478].

Большая часть ферментов гликолиза получена в кристаллическом виде и подробно изучена. Эти ферменты легко экстрагируются из кле-

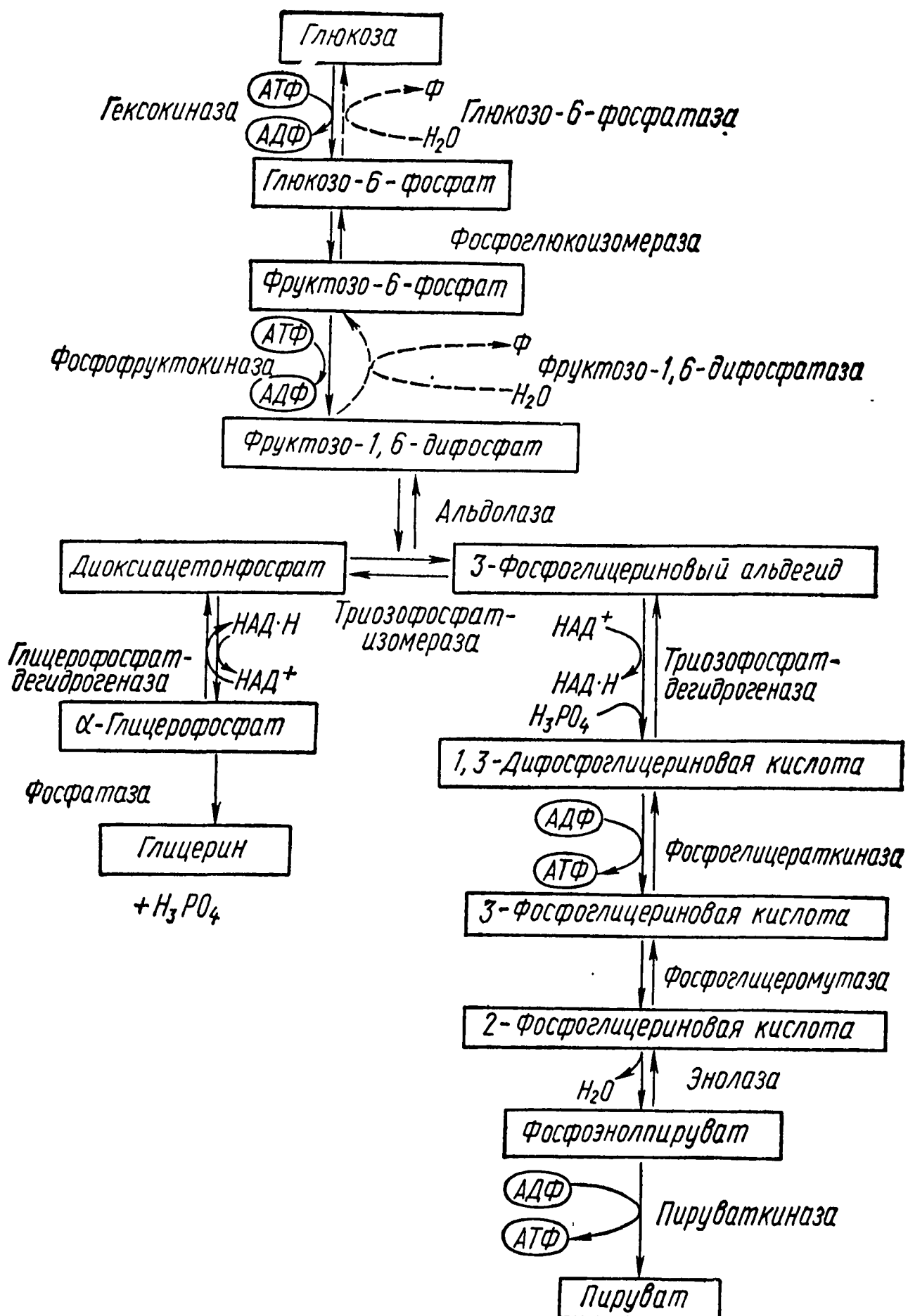


Рис. 92. Схема гликолиза Эмбдена — Мейергофа — Парнаса.

ток в растворимом виде, в связи с чем считают, что они локализируются в растворимой части цитоплазмы. Гликолитические ферменты широко распространены и изучены у многих видов грибов [601, 685, 776].

V.10.2.2. ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ [51, 144, 208, 260, 478]

Схема ЭМП не объясняет, как образуется рибоза, необходимая для синтеза РНК, и как используются микроорганизмами пентозы и другие углеводы в качестве энергетических источников. В связи с этим предположили существование других метаболических путей превращения сахаров. Исследованиями главным образом Варбурга, Диккен-

са, Хорекера у многих организмов был установлен путь превращения углеводов, получивший впоследствии название пентозофосфатного (ПФП) или гексозомонофосфатного пути (рис. 93). Два первых этапа ПФП представляют собой реакции дегидрирования (глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата). Именно реакции дегидрирования послужили поводом назвать данную схему окислительным путем обмена. Собственно этими двумя реакциями и завершается процесс окисления. Характерным для первых этапов ПФП является образование НАДФ · Н,

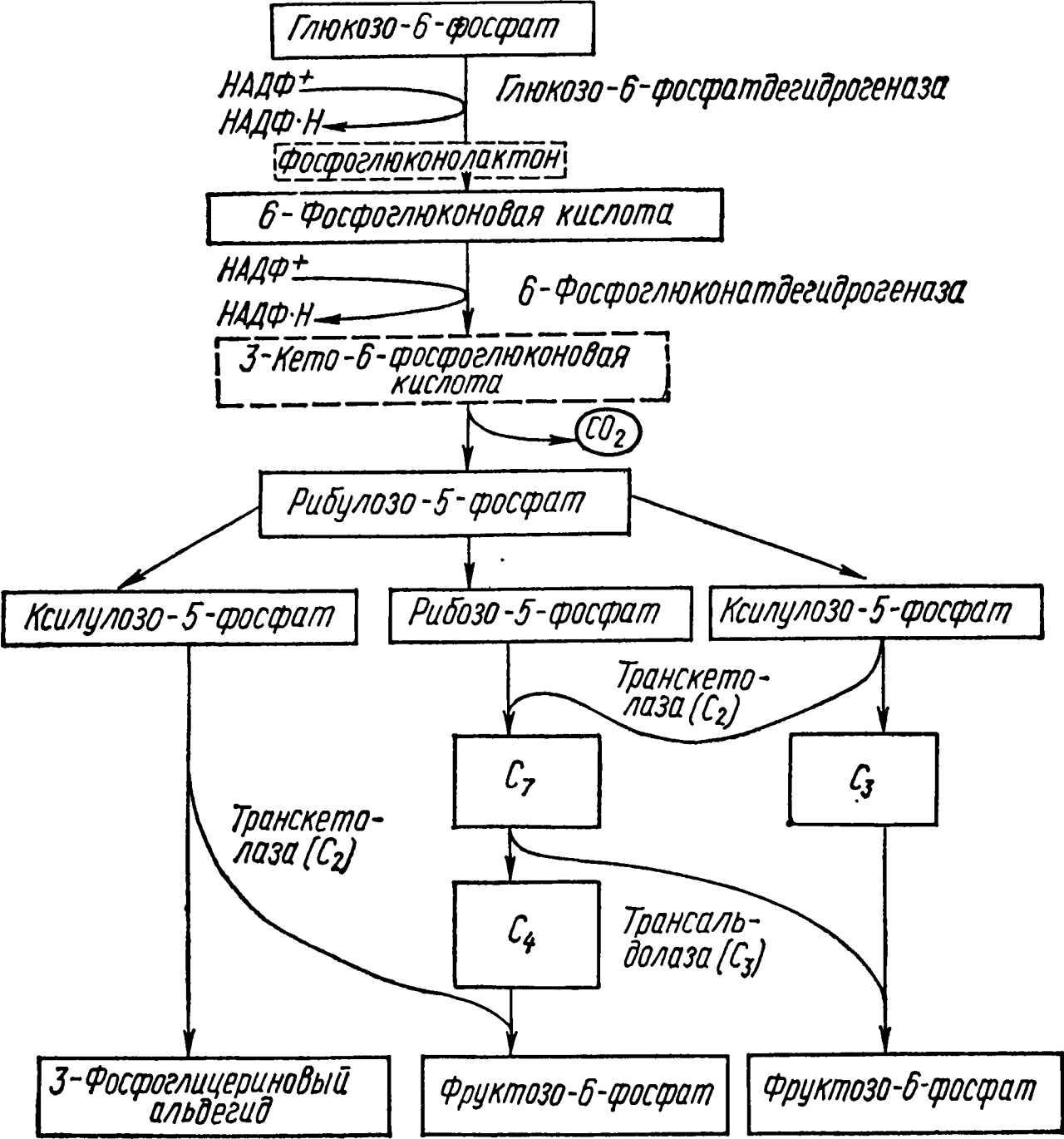


Рис. 93. Схема реакций пентозофосфатного цикла.

функция которого особенно важна для клеток, в которых осуществляется интенсивный восстановительный синтез жирных кислот и стероидов из предшественников.

Последующие реакции ПФП рассматриваются только как процессы взаимного превращения пентозо- и гексозофосфатов. Типичными для ПФП являются транскетолазная и трансальдолазная реакции. Первый из этих ферментов осуществляет две реакции: образование седогептулозо-7-фосфата и 3-фосфоглицеринового альдегида и фруктозо-6-фосфата и 3-фосфоглицеринового альдегида. Вторым — катализирует перенос остатка диоксиацетона от седогептулозо-7-фосфата или фруктозо-6-фосфата на 3-фосфоглицериновый альдегид или эритрозо-4-фосфат. Рибозофосфат, образующийся в ПФП, является предшественником нуклеотидов и НК.

Если рассматривать ПФП с точки зрения выработки энергии, то он в 2 раза менее эффективен, чем ЭМП; в ходе ПФП образуется лишь одна молекула АТФ на одну молекулу глюкозы. Дальнейшее превращение 3-фосфоглицеринового альдегида в пируват происходит по схеме ЭМП, таким образом, ПФП является как бы отклонением от гликолитического пути.

Реакции ПФП протекают в растворимой части цитоплазмы клеток. Ферменты, катализирующие эти реакции, выделены в кристаллическом виде.

V.10.2.3. ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

[16, 51, 144, 208, 260, 478]

У многих микроорганизмов, в том числе и у грибов, полное окисление пирувата, образовавшегося в результате ПФП или ЭМП, происходит в процессе, который получил название цикла трикарбонных кислот (ЦТК), или цикла Кребса. ЦТК является основным источником энергии для биосинтетических процессов, протекающих в клетке. Функции ЦТК не ограничиваются превращением пирувата, хотя здесь мы

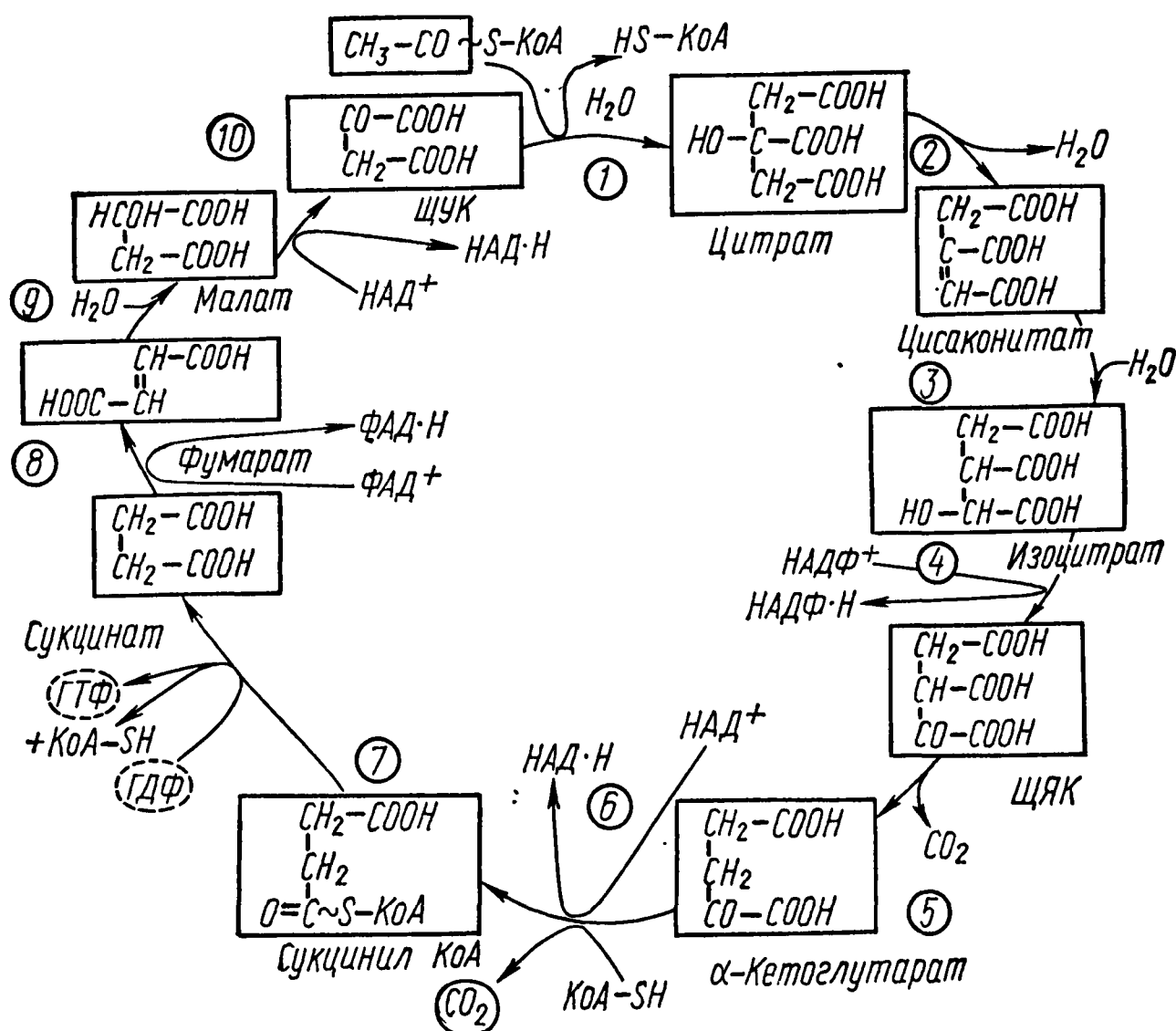


Рис. 94. Цикл трикарбонных кислот (цикл Кребса):

1 — цитрат-синтаза; 2, 3 — аконитаза; 4, 5 — изоцитратдегидрогеназа; 6 — α-кетоглутаратдегидрогеназа; 7, 8 — сукцинатдегидрогеназа; 9 — фумараза; 10 — малатдегидрогеназа.

в основном остановимся на этой его функции. ЦТК является «фокусом», в котором сходятся все метаболические пути, поэтому его реакции и субстраты (рис. 94) играют важную роль в биосинтезе многих соединений.

Пируват до включения в ЦТК окисляется с помощью весьма сложного механизма, катализируемого пируватдегидрогеназной системой,

до ацетил-КоА — активной формы уксусной кислоты. Процесс этот протекает в аэробных условиях. Анаэробные пути превращения пирувата здесь не рассматриваются. Помимо НАД и КоА в данной реакции участвуют следующие кофакторы: ТПФ, липоевая кислота и ионы магния. Этот процесс не входит в ЦТК, а представляет собой стадию, необходимую для включения углеводов в цикл.

Первая реакция ЦТК катализируется ферментом цитрат-синтазой и заключается в конденсации ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой (ЩУК) с образованием лимонной кислоты. Лимонная кислота под действием аконитазы превращается в изолимонную. Аконитаза ускоряет обратное превращение цис-формы аконитовой кислоты в лимонную и изолимонную. Следующая реакция цикла — окисление изолимонной кислоты, катализируемая изоцитратдегидрогеназой, представляет особый интерес, поскольку является лимитирующей для ЦТК в целом. Многие микроорганизмы содержат два типа изоцитратдегидрогеназ — НАД- и НАДФ-зависимые. Однако роль катализатора окисления изоцитрата играет только НАД-зависимый фермент, в то время как НАДФ-зависимый участвует в различных вспомогательных процессах ЦТК.

Образующийся в результате этой реакции α -кетоглутарат окисляется α -кетоглутаратдегидрогеназой (аналогично пируватдегидрогеназной реакции) в янтарную кислоту. Последняя с помощью сукцинатдегидрогеназы окисляется в фумаровую кислоту. Гидратация фумаровой кислоты, осуществляемая фумаразой, приводит к образованию яблочной кислоты. Дальнейшее окисление яблочной кислоты малатдегидрогеназой приводит к регенерации ЩУК — начальному акцептору активного ацетата. За исключением реакции окисления α -кетоглутарата в сукцинил-КоА, любая из реакций ЦТК легко обратима.

Углеродные атомы ацетата в ходе ЦТК освобождаются в виде углекислоты в реакциях окислительного декарбоксилирования изолимонной и α -кетоглутаровой кислот, а восемь атомов водорода, образующихся в процессах дегидрирования субстратов ЦТК специфическими дегидрогеназами, присоединяются к коферментам (шесть к НАД⁺ и два — к ФАД⁺). При аэробном дыхании эти атомы водорода в конечном счете связываются с кислородом с образованием воды. Однако до этого они перемещаются вдоль цепи молекул-переносчиков, составляющих цепь переноса электронов, или дыхательную цепь. Перенос электронов по дыхательной цепи сопряжен с образованием макроэргических (богатых энергией) фосфатных связей в результате окислительного фосфорилирования. На каждую молекулу окисленного пирувата образуется 15 макроэргических фосфатных связей, т. е. эффективность данного процесса составляет 66%.

Ферменты, катализирующие реакции ЦТК, обнаружены в экстрактах мицелия ряда грибов, однако полным набором ферментов, необходимых не только для всех реакций ЦТК, но и для переноса электронов к кислороду, обладают только митохондрии или аналоги этих субклеточных структур.

V.10.2.4. ГЛИОКСИЛАТНЫЙ ЦИКЛ [51, 144, 208, 260, 478]

Существует целый ряд вспомогательных ферментативных реакций, в результате которых промежуточные метаболиты выводятся из циклов. Эти реакции называются анаплеротическими. Анаплеротическую

функцию выполняет и так называемый глиоксилатный цикл, характерный для грибов. В тех случаях, когда ацетат или другое двухуглеродное соединение используется не только в качестве источника энергии, но и источника промежуточных метаболитов, как правило, вместо классического ЦТК функционирует глиоксилатный цикл (рис. 95).

Ключевыми ферментами этого цикла являются изоцитратлиаза, катализирующая расщепление изолимонной кислоты на янтарную и глиоксиловую, и малат-синтаза, осуществляющая присоединение глиоксиловой кислоты к ацетил-КоА с образованием яблочной кислоты

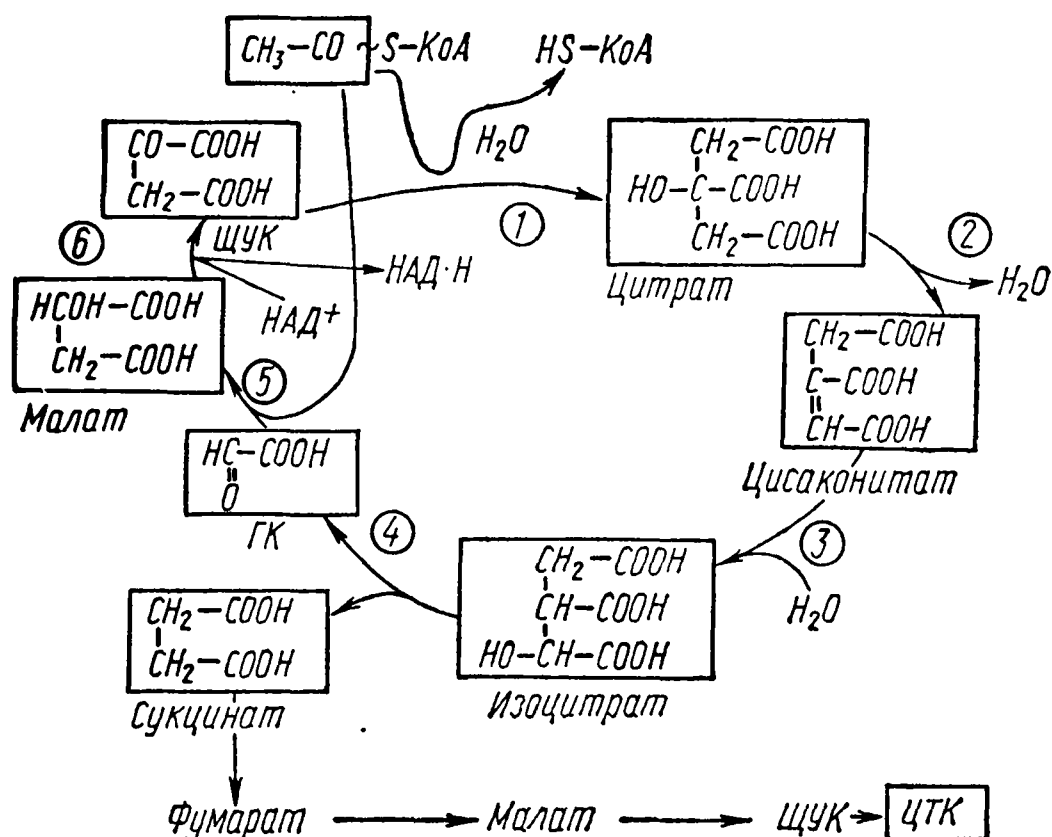


Рис. 95. Глиоксилатный цикл:

1 — цитрат-синтаза; 2, 3 — аконитаза; 4 — изоцитрат-лиаза; 5 — малатсинтаза; 6 — малатдегидрогеназа.

Помимо этих ферментов для нормального функционирования цикла необходимо и одновременное участие еще трех ферментов ЦТК: цитрат-синтазы, аконитазы и малатдегидрогеназы и наличие цепи переноса электронов для окисления восстановленного НАД. В результате одного оборота цикла окисляются две молекулы ацетил-КоА и образуется одна молекула янтарной кислоты, которая используется в процессах синтеза углеводов.

Таким образом, глиоксилатный цикл поставляет для различных процессов биосинтеза как энергию, так и четырехуглеродные промежуточные продукты. Считается, что для пополнения ЦТК во время превращений глюкозы, а также пирувата и других C_3 -соединений глиоксилатный цикл, по-видимому, не играет существенной роли.

Ферменты глиоксилатного цикла обнаруживаются в бесклеточных экстрактах различных грибов.

V.10.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Метаболическую функцию ферментов определяют по их максимальной активности. При этом следует учитывать, что промежуточные метаболиты содержатся в клетке в субоптимальных концентрациях, что не позволяет отдельным ферментам функционировать с максималь-

ной скоростью, а некоторые метаболиты являются общими для нескольких путей превращения углеводов или выполняют регуляторную функцию. В связи с этим, прежде чем сделать заключение о роли того или иного цикла в жизнедеятельности исследуемого организма, необходимо провести тщательный анализ данных, учитывая не только активность отдельных ферментов, но и содержание промежуточных метаболитов. Окончательное же заключение об удельной активности отдельных путей метаболизма углеводов можно сделать на основании данных радиореспирометрических исследований.

Исследования по определению активности ферментов, участвующих в превращении углеводов, предусматривают ряд последовательных этапов, включающих культивирование исследуемого штамма, предварительную подготовку мицелия, его дезинтеграцию, выделение субклеточных фракций или получение бесклеточных экстрактов и собственно определение активности.

V.10.3.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ

Культивирование грибов для ферментативных исследований осуществляют одним из методов, приведенных в разделе III, которые предусматривают строго контролируемый посев на среды определенного состава и последующее выращивание в стандартных условиях. Для исследования активности ферментов углеводного обмена могут быть использованы споры и мицелий. Обычно исследуют мицелий активно растущей культуры, хотя для изучения активности в динамике культивирования грибов пригоден мицелий на разных фазах развития.

V.10.3.2. ПОДГОТОВКА МИЦЕЛИЯ

Подготовка мицелия включает фильтрование и обязательное отмывание его от культуральной среды. Обычно для этой цели применяют либо минеральную основу используемой для культивирования среды, либо подходящий буферный раствор. Растворы, используемые для промывания, предварительно охлаждают до 2—4° С.

Избыток влаги из отмытого мицелия удаляют, помещая его между двумя слоями фильтровальной бумаги. После этого его либо измельчают, либо замораживают в жидком азоте и хранят в холодильном шкафу. В последнем случае мицелий пригоден для исследования ферментов в течение месяца. Лучшим способом замораживания мицелия является его прессование между двумя пластинами из алюминиевой фольги, предварительно охлажденными в жидком азоте. Такая процедура обеспечивает увеличение поверхности и глубины замораживания [762, 833].

V.10.3.3. ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ МИЦЕЛИЯ

Разрушение мицелия осуществляют одним из методов, приведенных в разделе IV.6.3.1. Удобен метод, предложенный в работе [762]. Мицелий гриба замораживают, погружая в жидкий азот на 5—10 с, и затем тщательно растирают в течение 20 мин в предварительно охлажденной сухим льдом или жидким азотом фарфоровой ступке с двукратным (по массе) количеством отмытого хромовокислой смесью кварцевого песка и одним объемом буфера, используемого для изучения активности фермента.

V.10.3.4. ПОЛУЧЕНИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ

Дезинтегрированный мицелий может быть использован либо для выделения субклеточных фракций методом, приведенным в разделе IV.6.3.2, либо для получения бесклеточных ферментных препаратов. В последнем случае к разрушенному мицелию добавляют еще один объем предварительно охлажденного того же буферного раствора и экстрагируют на холоду с помощью обычного тканевого гомогенизатора или магнитной мешалки в течение 20 мин. Бесклеточные ферментные растворы получают путем центрифугирования суспензии при 30000 *g* в течение 30 мин на холоду. После удаления поверхностного маслянистого слоя надосадочную жидкость используют в качестве ферментных препаратов, которые хранят при температуре 2—4° С. Такие препараты сохраняют активность в течение нескольких часов, а в лиофилизированном состоянии — несколько месяцев.

V.10.3.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ

Разработано множество методов определения активности ферментов, катализирующих отдельные реакции процессов углеводного обмена. Наиболее перспективны спектрофотометрические методы, которые характеризуются высокой точностью и быстротой выполнения. В основе этих методов лежит способность некоторых коферментов (НАД, НАДФ) изменять поглощение света с длиной волны 340 нм в результате окисления или восстановления субстрата, которое учитывается в прямых или совокупных реакциях. Скорость увеличения или снижения абсорбции при 340 нм в начальный период реакции обычно пропорциональна скорости исследуемой ферментативной реакции.

Все компоненты реакционной смеси, за исключением субстрата, соединяют в кварцевой кювете диаметром 1 см при постоянной температуре (обычно 20 или 25° С) и доводят дистиллированной водой до конечного объема 3 мл (объем может быть иным). Началом реакции считают момент добавления субстрата в реакционную смесь. Изменение абсорбции определяют в течение 2—5 мин через определенные интервалы (15—30 с). Результаты подсчитывают на линейной части кривой изменения экстинкции. Эндогенную активность определяют в контрольной пробе (без субстрата) и вычитают из данных опыта.

Специфическую активность фермента выражают в микромолях субстрата, превращенного за 1 мин 1 мг белка (фермента) и рассчитывают по формуле $V = Ed/\epsilon m$, где E — изменение оптической плотности за 1 мин; d — объем реакционной системы; ϵ — молярный коэффициент экстинкции (для НАД и НАДФ составляет $6,22 \cdot 10^6$ см²/моль); m — содержание белка в пробе.

Содержание белка в ферментных препаратах измеряют общепринятыми методами и задают в реакционную смесь в количестве 1 мг. Однако в зависимости от активности исследуемых ферментов, а также от других условий содержание белка в смеси можно изменять. Количественное соотношение отдельных ингредиентов реакционной смеси при изучении активности ферментов различных грибов в значительной степени отличается. Это же в равной мере касается и значений рН. В связи с этим рекомендуется [617] для исследуемых организмов проводить уточнение оптимальных значений рН и количественного соотношения других компонентов среды в предварительных экспериментах. Используемые в реакционных системах минеральные компонен-

ты должны быть максимально очищены от примесей тяжелых металлов, которые в некоторых случаях могут выступать в качестве ингибиторов ферментов.

Ниже приведены реакционные смеси для спектрофотометрического определения активности отдельных ферментов рассматриваемых путей превращения углеводов.

Ферменты гликолитического пути. *Гексокиназа* (К.Ф.2.7.1.1). Реакционная смесь для спектрофотометрического определения гексокиназной активности включает (мкмоль): 200 Трис-буфера, рН 7,3; 15 MgCl_2 ; 0,5 НАДФ^+ ; 9 АТФ; 6 глюкозы (или другой гексозы); 0,1 глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 0,2 мл ферментного препарата. Реакцию начинают добавлением НАДФ^+ , необходимого для дегидрирования образуемого глюкозо-6-фосфата. Необходимо указать, что гексокиназная активность является общей для ЭМП и ПФП [13, 228, 601].

Фосфоглюкоизомераза (К.Ф.5.3.1.9). Состав реакционной смеси для определения активности этого фермента включает (мкмоль): 200 Трис-буфера, рН 7,3; 15 MgCl_2 ; 0,5 НАДФ^+ ; 4 фруктозо-6-фосфата; 7 ед. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 0,2 мл испытуемого ферментного препарата [601, 685, 776].

Фосфофруктокиназа (К.Ф.2.7.1.11) относится к числу регуляторных; ее активность определяет скорость гликолиза в целом. Для определения активности фосфофруктокиназы используют смесь, состоящую из (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 0,5 $\text{НАД} \cdot \text{Н}$; 9,45 АТФ; 10 цистеина- HCl ; 4 фруктозо-6-фосфата; 0,2 мл ферментного препарата [601, 662, 685, 776]. Поскольку активность этого фермента определяется совокупной реакцией $\text{НАД} \cdot \text{Н}$ -зависимого восстановления диоксиацетонфосфата, смесь должна включать также 1 мкг триозофосфатизомеразы и 9 мкг глицерофосфатдегидрогеназы [506].

Альдолаза (К.Ф.4.1.2.13) — специфический фермент ЭМП; обнаружение его активности указывает на функционирование гликолитического пути у исследуемого штамма. Состав опытной смеси для определения альдолазной активности (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 7,3; 15 MgCl_2 ; 0,5 $\text{НАД} \cdot \text{Н}$; 4 фруктозо-1,6-дифосфата; 1 мкг триозофосфатизомеразы и 9 мкг глицерофосфатдегидрогеназы; 0,2 мл ферментного препарата. Пусковым моментом реакции является добавление фруктозо-1,6-дифосфата [228, 601, 685, 776].

Триозофосфатизомераза (К.Ф.5.3.1.1). Реакционная смесь для определения активности этого фермента состоит из (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 10 цистеина- HCl ; 0,05 $\text{НАД} \cdot \text{Н}$; 2 глицеральдегидтрифосфата; 0,02 мл глицерофосфатдегидрогеназы и 0,2 мл ферментного препарата [516, 601, 685].

Триозофосфатдегидрогеназа (К.Ф.1.2.1.12). О ходе процесса, катализируемого этим ферментом, судят по восстановлению НАД^+ в прямой реакции. Для определения активности фермента используют смесь (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 10 цистеина- HCl ; 25,5 арсената; 60 фторида натрия; 0,5 НАД^+ ; 3,5 3-фосфоглицеринового альдегида; 0,2 мл ферментного препарата. В качестве контрольной используют вторую кювету, содержащую 2,8 мл буферного раствора. Измеряют начальную абсорбцию при 340 нм, и затем в обе кюветы добавляют 0,2 мл смеси субстрата и арсената. Из полученных показателей вычитают значение начальной абсорбции. Эта реакция — один из наиболее важных этапов гликолиза, который используется также в ПФП. Энергия, освобождаемая при окислении

альдегидной группы 3-фосфоглицеринового альдегида, сохраняется в форме продукта окисления — 1,3-фосфоглицерата — и освобождается в последующей реакции при помощи фосфоглицераткиназы [516, 601, 685].

Фосфоглицераткиназа (К.Ф.2.7.2.3). Для определения активности этого фермента используют реакцию смесь следующего состава (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 10 цистеина- HCl ; 13,5 АТФ; 0,5 НАД · Н; 60 фтористого натрия; 4 трифосфоглицерата; 0,2 мл испытуемого ферментного препарата [601, 685].

Фосфоглицеромутаза (К.Ф.2.7.5.3). Состав реакционной смеси для определения активности этого фермента включает (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 5 АДФ; 0,01 мл лактатдегидрогеназы; 5 НАД · Н; 4 3-фосфоглицерата; 60 фтористого натрия; 0,2 мл ферментного препарата [685].

Энолаза (К.Ф.4.2.1.11). Для определения активности этого фермента используют реакцию смесь, состоящую из (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 5 АДФ; 0,01 мл лактатдегидрогеназы; 5 НАД · Н; 4 2-фосфоглицерата; 60 фтористого натрия и 0,2 мл ферментного раствора [601, 685].

Пируваткиназа (К.Ф.2.7.1.40). Реакционная смесь для определения активности этого фермента включает (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl_2 ; 5 АДФ; 0,01 мл лактатдегидрогеназы; 5 НАД · Н; 4 фосфоэнолпирувата; 60 фтористого натрия и 0,2 мл ферментного раствора [601, 685].

Методики определения активности других ферментов гликолитического пути можно найти в работах [228, 516, 601, 662, 685].

Ферменты пентозофосфатного пути. *Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа* (К.Ф.1.1.1.49) и *6-фосфоглюконатдегидрогеназа* (К.Ф.1.1.1.44) являются наиболее характерными ферментами ПФП; реакции, катализируемые ими, НАД⁺-зависимы. Именно эти ферменты определяют окислительную функцию пути в целом. Для определения активности этих ферментов используют аналогичные реакционные смеси, состоящие из (мкмоль): 200 Трис-буфера, рН 7,3; 15 MgCl_2 ; 0,5 НАДФ⁺; 0,2 мл ферментного препарата. В качестве субстратов для определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы используют 4 мкМ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата соответственно [228, 270, 601, 685].

Типичными ферментами ПФП являются также транскетолаза и трансальдолаза, которые осуществляют вторую важную функцию пути — взаимопревращение сахаров с различным числом углеродных атомов.

Транскетолаза (К.Ф.2.2.1.1). В результате транскетолазной реакции образуется семиуглеродный кетосахар — седогептулозо-7-фосфат и 3-фосфоглицериновый альдегид. Реакция считается основной для этого фермента и зависит от тесно связанного с ним ТПФ. Реакционная смесь для определения активности транскетолазы включает (мкмоль): 200 Трис-буфера, рН 7,3; 15 MgCl_2 ; 0,5 НАД · Н; 2,4 ТПФ; 4 рибозо-5-фосфата и 0,2 мл ферментного препарата. Поскольку активность определяется совокупной реакцией восстановления диоксиацетонфосфата, смесь должна также содержать 1 мкг триозофосфатизомеразы и 9 мкг глицерофосфатдегидрогеназы [228, 601, 685].

Трансальдолаза (К.Ф.2.2.1.2) действует на продукты транскетолазной реакции с образованием фруктозо-6-фосфата и эритрозо-4-фосфата. Реакционная смесь для определения активности этого фермента включает: 0,94 мл 0,04 М триэтаноламин- HCl буфера, рН 7,6;

0,2 мл 0,14 М фруктозо-6-фосфата; 0,01 мл 0,01 М НАД · Н; 0,02 мл 0,01 М эритрозо-4-фосфата; 0,001 мл смеси ферментов: глицерофосфатдегидрогеназы и триозофосфатизомеразы (10 мг/мл); 0,2 мл ферментного препарата [228, 796].

Ферменты цикла трикарбоновых кислот. Пировиноградная кислота, образующаяся в результате пентозофосфатного и гликолитического путей расщепления углеводов в аэробных условиях подвергается полному окислению в ряде последовательных реакций, катализируемых цитрат-синтазой, аконитазой, изоцитрат-, α -кетоглутарат-, сукцинат- и малатдегидрогеназами и др. Ниже изложены методы определения активности этих ферментов.

Цитрат-синтаза (К.Ф.4.1.3.7). В результате реакции конденсации ацетил-КоА со ЩУК, катализируемой этим ферментом, образуется лимонная кислота и КоА. Связывание SH-групп КоА с помощью реактива Элмана [575] и лежит в основе метода определения активности цитрат-синтазы. Образующийся меркаптит-КоА дает характерную абсорбцию при 412 нм (молярный коэффициент экстинкции этого вещества — 13,6). Реакционная смесь включает (мкмоль): 100 Трис-буфера, рН 8,5; 0,25 ЩУК; 0,25 ацетил-КоА; 0,1 моль реактива Элмана; 0,2 мл ферментного препарата [270, 727].

Изоцитратдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.41) катализирует окислительное декарбоксилирование изолимонной кислоты до α -кетоглутаровой и является регуляторным ферментом для ЦТК. Поскольку фермент НАД⁺-зависим, то его активность определяют изменением поглощения кофермента при 340 нм в прямой реакции. Реакционная смесь включает (мкмоль): 50 Трис-буфера, рН 7,5; 0,25 изоцитрата; 4 НАД⁺; 0,5 аденозинмонофосфата; 10 MgCl₂; 5 цианида калия; 0,2 мл ферментного препарата. Используя эту смесь, с помощью приведенной совокупной реакции можно также определить активность *аконитазы* (К.Ф.4.2.1.3). Однако в этом случае вместо изолимонной кислоты в качестве субстрата используют лимонную.

α -Кетоглутаратдегидрогеназа представляет собой комплекс ферментов, близких к пируватдегидрогеназному комплексу. Реакционная смесь для определения активности этого фермента включает (мкмоль): 200 глицил-глицинового буфера, рН 8,5; 15 MgCl₂; 0,5 НАДФ · Н; 7,8 ЭДТА; 300 аммонийацетата; 4 α -кетоглутарата и 0,2 мл ферментного препарата [601, 685].

Сукцинат-тиокиназа (К.Ф.6.2.1.5). Реакционная смесь для определения активности этого фермента включает: 0,1 моль Трис-сукцинатного буфера, рН 7,4; 0,2 моля MgCl₂ в 2 молях KCl; 31 ммоль фосфоэнолпирувата; 4 ммоль НАД · Н; 1 ммоль гуанозинтрифосфата; 1 ммоль КоА; 2 мг/мл пируваткиназы; 2 мг/мл лактатдегидрогеназы и 0,2 мл ферментного препарата [787].

Сукцинатдегидрогеназа (К.Ф.1.3.99.1), катализирующая окисление янтарной кислоты до фумаровой, является флавопротеидом, в молекуле которого с белком ковалентно связан ФАД⁺, способный восстанавливаться и затем отдавать электроны различным неприродным акцепторам, в частности феррицианиду. Эту особенность фермента используют для определения его активности. Реакционная система для спектрофотометрического определения сукцинатдегидрогеназы включает (мкмоль): 3 феррицианида калия, растворенного в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2; 30 цианида калия; 40 янтарной кислоты; 0,2 мл ферментного препарата. Оптическую плотность измеряют при 400 нм как функцию времени [270, 519].

Малатдегидрогеназа (К.Ф.1.1.1.37) осуществляет окисление яблочной кислоты в ЩУК в НАД⁺-зависимом процессе. В основе метода определения активности фермента лежит изменение оптической плотности при окислении кофермента в обратимой реакции. Реакционная система включает (мкмоль): 200 Трис-буфера, рН 7,3; 15 MgCl₂; 0,5 НАД⁺; 3 ЩУК; 0,2 мл ферментного препарата. Изменение оптической плотности учитывают при 340 нм [270, 601].

Ферменты глиоксилатного цикла. Ключевыми ферментами этого цикла являются изоцитрат-лиаза и малат-синтаза. Ниже приведено описание методов определения активности этих ферментов.

Изоцитрат-лиаза (К.Ф.4.1.3.1) катализирует расщепление изолимонной кислоты в янтарную и глиоксиловую. В основе метода лежит способность глиоксиловой кислоты реагировать с фенилгидразинами. Образующийся фенилгидразон глиоксиловой кислоты при спектрофотометрии дает характерное поглощение при 324 нм (молярный коэффициент экстинкции — 17,0). Реакционная смесь включает (мкмоль): 75 фосфатного буфера, рН 6,85; 8 фенилгидразина-HCl; 4 цистеина-HCl; 10 MgCl₂; 4 изолимонной кислоты; 0,2 мл ферментного препарата [270, 564, 722].

Малат-синтаза (К.Ф.4.1.3.2) осуществляет конденсацию глиоксиловой кислоты с ацетил-КоА с образованием яблочной кислоты и КоА. В основе метода лежит тот же принцип, что и при определении цитрат-синтазы. Реакционная смесь состоит из (мкмоль): 100 Трис-буфера, рН 8,3; 0,25 ацетил-КоА; 10 MgCl₂; 0,33 реактива Элмана; 5 глиоксиловой кислоты; 0,2 мл ферментного препарата. Оптическую плотность измеряют при 412 нм (молярный коэффициент экстинкции образующегося меркаптида-КоА 13,6) [270, 564, 722].

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКА У ГРИБОВ

Белки являются одним из главных компонентов структурных элементов клетки и принимают активное участие в процессах метаболизма. В организме грибов они выполняют самые разнообразные функции: защитную, каталитическую, регуляторную, транспортную, трофическую и др. Молекулы белка построены из аминокислот. В настоящее время описано около 200 аминокислот; из них лишь 22 входят в состав белков.

Большинство физиологических процессов связано с обменом аминокислот, осуществляемым с помощью чрезвычайно лабильных и многообразных реакций. Аминокислоты поставляют материал не только для синтеза белков, НК, витаминов, но и антибиотиков, алкалоидов, пигментов, токсинов и др. Методы определения белков и аминокислот у микроскопических грибов очень трудоемки; их описание до сих пор не было обобщено в специальном издании. Ниже приведено описание некоторых из них.

VI.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

VI.1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Изучение аминокислот с помощью хроматографии, колориметрии, электрофореза, методов, основанных на использовании мутантов с разной потребностью в отдельных аминокислотах, и других позволило выяснить некоторые особенности обмена грибов, имеющие общепиологическое значение.

Хроматографические методы подразделяют на адсорбционные, ионообменные, осадочные, распределительные. Широкое распространение получила хроматография с наложением электрического поля. Метод распределительной хроматографии на бумаге — один из наиболее быстрых, точных и простых методов анализа сложных смесей веществ (химические методы определения ряда аминокислот очень трудоемки, недостаточно чувствительны и специфичны) (табл. 14).

В настоящее время всеобщее признание получил метод количественного определения аминокислот с помощью автоматических анализаторов [12, 44, 142]. Перед анализом исследуемое вещество освобождают от аммиака и растворяют в буферном растворе (0,2 н. NaCl и 0,01 н. HCl) или 10%-ном растворе изопропилового спирта. Количество

Т а б л и ц а 14. Сравнение различных методов определения аминокислот [390]

Метод анализа	Преимущества	Недостатки
Х и м и ч е с к и е м е т о д ы		
Выделение отдельных аминокислот Колориметрия	Воспроизводимость результатов Может использоваться в отдельных случаях для определения, например, цистеина, триптофана, тирозина в интактных белках	Большое количество исходного материала Недостаточная чувствительность и специфичность
Ф и з и к о - х и м и ч е с к и е м е т о д ы		
Масс-спектрометрия	Высокая точность	Сложное, дорогостоящее оборудование и аминокислоты, содержащие тяжелый изотоп азота (^{15}N)
Хроматография на бумаге	Высокая чувствительность, быстрота получения ответа	Ограниченная точность и специфичность. Трудность обнаружения ничтожных количеств аминокислот, особенно в неочищенных образцах
Ионообменная хроматография	Высокая точность, специфичность, скорость, воспроизводимость результатов при малых количествах материала. Метод удобен для полного анализа аминокислот в образцах неизвестной природы	Сложное оборудование, высокая квалификация сотрудников для осуществления анализа и интерпретации результатов. Конфигурация веществ не может быть определена
Б и о л о г и ч е с к и е м е т о д ы		
Определение на животных	Специфичность для изомеров	Дорогостоящий, длительный, обычно недостаточно надежный и точный

Метод анализа	Преимущества	Недостатки
Биологические методы		
Ферментативный	Специфичность для изомеров	Пригоден для достаточно специфических ферментных препаратов. Необходимо сначала вырастить организм, а затем выделить ферменты. Для некоторых аминокислот непригоден, часто мешает интерференция аминокислот, присутствующих в гидролизате
Микробиологический	Точность такая же, как и при химических методах. Необходимы малые количества анализируемого материала. Специфичны только для одной энантиоморфной формы аминокислот. Несложное оборудование. Удобен для определения отдельных аминокислот в неизвестном субстрате	При определении большого числа аминокислот требуется несколько большее количество материала, чем для хроматографии. Необходимы постоянные контроли для получения стабильных результатов

анализируемого образца в среднем должно составлять 0,25—0,35 мкмоля, его объем может варьировать. Оптимальным считают объем 0,1—0,5 мл.

Начиная с 1956—1958 гг. широко применяют ТСХ. С ее помощью проводят анализ гидрофильных соединений, которые можно фракционировать и на бумаге, однако со значительно меньшей скоростью. Этот метод имеет и другие преимущества [15, 142, 446]. При ТСХ фракционирование аминокислот осуществляется в тонком слое силикагеля или целлюлозы. В отношении отдельных аминокислот хроматография на силикагеле характеризуется большей чувствительностью, чем хроматография на целлюлозе, но в тонком слое целлюлозы разделение происходит лучше [422]. Простота выполнения ТСХ и высокая разрешающая способность ионообменной хроматографии породили стремление объединить эти два метода и разработать технологию тонкослойной хроматографии в фиксированном слое ионообменника [142].

В настоящей работе описаны основные этапы определения аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге, который с успехом апробирован нами на большом количестве штаммов микроскопических грибов [166, 168].

VI.1.2. МЕТОД РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Метод основан на различной способности веществ распределяться между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Одной жидкой неподвижной фазой обычно является вода, второй — насыщенный водой органический растворитель, не смешивающийся или частично смешивающийся с водой.

При непрерывном прохождении растворителя через хроматографическую бумагу происходит перенос разделяемых веществ от точки их нанесения на бумагу к точке, находящейся на некотором расстоянии от точки нанесения в направлении течения растворителя. Поскольку коэффициенты распределения веществ между двумя фазами различны, разделяемые вещества под действием подвижной фазы продвигаются на разное расстояние.

Различают *одномерную* и *двухмерную* хроматографию. При одномерной хроматографии растворитель пропускают по бумаге только в одном направлении, при двухмерной после пропускания растворителя в одном направлении бумагу высушивают и вновь пропускают другой растворитель в направлении, противоположном движению первого растворителя.

VI.1.2.1. БУМАГА

Для получения четких хроматограмм необходимо использовать бумагу высокого качества [272]. Бумага должна обеспечивать скорость движения растворителя, достаточную для достижения полного разделения веществ между подвижной и неподвижной фазами и предотвращения интенсивного испарения растворителя. Обычно используют бумагу Ленинградская мелленая, средняя и быстрая (ЛМ, ЛС, ЛБ); из иностранных марок наиболее употребительна бумага Ватман № 1, № 2; FN-1 и FN-11. Эти сорта бумаги обеспечивают скорость движения растворителя 1—2 см/ч.

При точных количественных определениях хроматографическую бумагу необходимо очищать от следов зольных элементов. Для этого рекомендуется пропускать через бумагу в течение 1—2 дней 0,1%-ный раствор 8-оксихинолина в *n*-бутиловом спирте, который связывает следовые количества металлов и вымывает их из бумаги. После этого листы бумаги высушивают и используют для определений. Операции с бумагой следует проводить только в перчатках [359].

VI.1.2.2. РАСТВОРИТЕЛИ

Универсальный растворитель, с помощью которого можно было бы разделить все аминокислоты на одной хроматограмме, до сих пор не найден. Поэтому обычно готовят растворители, каждый из которых пригоден для разделения той или иной группы аминокислот [720].

Быстродвижущиеся аминокислоты — фенилаланин, лейцины, метионин, валин, γ -аминомасляную кислоту — удобно определять в *o*-крезоле, насыщенном фосфатным буфером (рН 6,2). Двукратное пропускание *o*-крезола с промежуточным высушиванием бумаги в течение 10 мин при температуре 60°С позволяет разделить глютамин и аланин.

Для определения медленно движущихся аминокислот — глутаминовой, аспарагиновой и серина — используют фенол, насыщен-

ный фосфатным буфером (рН 12). Раствор *m*-крезола и фенола в боратном буфере (рН 8,3) используют для разделения тирозина, γ -аминомасляной кислоты, гомосерина, глутамина и аланина [439].

Растворители, применяемые для хроматографического разделения аминокислот, предварительно обязательно очищают перегонкой. При выполнении одномерных хроматограмм для лучшего разделения аминокислот предложен метод многократного пропускания растворителя. В этом случае растворитель пропускают по бумаге несколько раз, причем перед каждым новым пропусканием его удаляют с хроматограммы высушиванием [197].

Системы растворителей: *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (75 : 15 : 10) при пятикратном пропускании используют для определения цистина и цистеина, аргинина, аспарагина, глутамина и цитруллина; *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (30 : 60 : 140) при трехкратном пропускании — для определения цистина, цистеина, орнитина, аланина, пролина, тирозина, γ -аминомасляной кислоты, фенилаланина, лейцина и изолейцина; *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1) при семикратном пропускании — для определения цистина и цистеина, орнитина, треонина, глутаминовой кислоты, триптофана, валина, фенилаланина, лейцина и изолейцина [359]; *бутиловый спирт* — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5 и 8 : 3 : 1) — для определения аспарагиновой кислоты, серина, глицина, глутаминовой кислоты и треонина (в случае нисходящей хроматографии растворитель пропускают 5 раз, а восходящей — 3 раза по 24 ч и 1 раз в течение 48 ч) [299].

VI.1.2.3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КАМЕРЫ

В качестве хроматографической камеры для нисходящих хроматограмм используют литые прямоугольные банки из стекла или высокие стеклянные банки с шлифованной стеклянной крышкой. Для получения хроматограмм небольших размеров могут быть использованы аквариумы или вегетационные сосуды. Помимо стекла для изготовления камер пригодна парафинированная (изнутри) фанера. В переднюю и заднюю стенки такой камеры вмонтированы стеклянные окна, позволяющие наблюдать за движением растворителя. Сверху камера закрывается крышкой из парафинированной фанеры, которая укрепляется с помощью винтов.

Для получения нисходящих хроматограмм подвижный растворитель наливают в хроматографическую кювету или ванночку, изготовленную из стеклянной трубки или нержавеющей стали диаметром 2—4 см. Длина кюветы определяется размером камеры. Полосы хроматографической бумаги должны быть обязательно закреплены. Для получения восходящих хроматограмм в боковых стенках сосуда сверху просверливают отверстия, вставляют в них стеклянные палочки на резиновых пробках, на которые подвешивают полосы бумаги. Для восходящей хроматографии могут быть использованы также высокие двухлитровые цилиндры, закрывающиеся шлифованной стеклянной пластинкой. В цилиндр помещают спираль, сделанную из стеклянной палочки, на которой укрепляют лист фильтровальной бумаги, также свернутый спиралью. Подобное устройство позволяет обходиться без больших камер и в то же время получать хроматограммы на широких листах бумаги (с большим числом проб). Размер, форма и конструкция камер зависят от задач исследования.

VI.1.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ R_f АМИНОКИСЛОТ

Отношение скорости движения фронта растворителя к скорости движения данной аминокислоты (R_f) не является строго постоянной величиной. Она изменяется в зависимости от сорта хроматографической бумаги, pH растворителя, температуры проявления, присутствия сопутствующих веществ и некоторых других факторов. Поэтому перед определением аминокислот методом хроматографии на бумаге рекомендуется проверить значение R_f аминокислот по принятой методике с использованием соответствующих растворителей и бумаги.

VI.1.2.5. МЕТЧИКИ

Точная идентификация соединений на хроматограммах во многих случаях не обеспечивается определением значения R_f . Для уточнения используют метод метчиков, или свидетелей. Для этого вместе с определяемыми аминокислотами на хроматографическую бумагу наносят растворы известных аминокислот и после хроматографирования и проявления хроматограмм сопоставляют цвет и положение пятен известных и определяемых аминокислот.

Готовят стандартные растворы (10 мг аминокислоты в 1 мл бидистиллированной воды). Плохо растворимые аминокислоты (тирозин, цистеин, аспарагиновая кислота) растворяют в подкисленной несколькими каплями HCl воде. На бумагу наносят по 15—20 мкг раствора каждой аминокислоты и по 20—30 мкг триптофана, гистидина, тирозина, лизина и пролина. Стандартной, более концентрированной смесью аминокислот является 0,002 М раствор кислоты в 0,1 н. HCl. Этот раствор может храниться в холодильнике с кусочком тимола длительное время. Для непосредственного использования смеси часть этого раствора разбавляют в 2—2,5 раза водой и наносят на хроматографическую бумагу 40—50 мкл [6].

VI.1.2.6. ТЕХНИКА ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

Для одномерных хроматограмм используют листы бумаги, нарезанные поперек волокон. 40—50 мкл исследуемой смеси, содержащей 60—70 мкг аминокислот, наносят микропипеткой на лист каждые 2,5—3 см, отступая от верхнего края 5—6 см. Бумагу помещают в хроматографические камеры и пропускают растворитель. Одновременно с исследуемой смесью разделению подвергается раствор смеси известных аминокислот.

При хроматографическом разделении веществ необходимо поддерживать строго определенную температуру (обычно $20-22 \pm 2^\circ\text{C}$). Для этой цели в лабораториях обычно служат термостатированные хроматографические комнаты. При колебаниях температуры во время хроматографирования четкость проявления веществ на хроматограммах ухудшается. Подавляющее большинство растворителей удаляют из бумаги высушиванием в токе воздуха при комнатной температуре или при температуре $40-60^\circ\text{C}$ в специальных сушильных шкафах. После удаления растворителя ее обрабатывают реактивами, дающими цветные реакции с изучаемыми аминокислотами. При этом пользуются пульверизатором либо быстро погружают бумагу в соответствующий раствор на 3—5 с. Для обнаружения аминокислот используют растворы нингидрина и изатина. После хроматографирования и проявления хроматограммы визуально сопоставляют цвет и положение пятен известных и определяемых аминокислот.

Присутствие в исследуемой смеси некоторых аминокислот выявляют с помощью проявителей (раствор изатина). При этом каждая аминокислота окрашивается различно. Так, изатин позволяет обнаружить весьма незначительные количества пролина. Вследствие того что каждая аминокислота при действии изатина приобретает специфический цвет или оттенок, удается идентифицировать аминокислоты с весьма близкими значениями R_f , что является существенным преимуществом метода.

Для идентификации глицина и аспарагиновой кислоты, имеющих близкие значения R_f , используют метод окраски нингидрином в сочетании с изатином [520]. При этом на месте расположения аспарагиновой кислоты, примерно через сутки, образуется зеленоватое пятно, на месте расположения глицина — белое на темном фоне. Раствор изатина готовят на 96%-ном этаноле, содержащем 1 мл ледяной уксусной кислоты на 100 мл спирта. Концентрация изатина — 1%. [76]. Чувствительность этого метода, однако, ниже, чем при использовании нингидрина. Многие аминокислоты обладают одинаковой чувствительностью к нингидрину, так что можно пользоваться одним калибровочным графиком при количественном определении группы аминокислот [344]. При реакции аминокислот с нингидрином (трикетогидринденем) сначала в результате взаимодействия аминокислоты с нингидрином возникает Шиффово основание. Затем оно претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминокетогидринден, который конденсируется с еще одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, получившую название «сине-фиолетовый Руэмана» по имени исследователя, впервые (в 1910 г.) изучившего эту реакцию. Реакция протекает в присутствии органических растворителей (ацетона, эталона, пиридина и др.), на основе которых готовят раствор нингидрина. Продукт реакции содержит радикал (R) исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску (голубую, красную и т. п.) соединений аминокислот с нингидрином [446].

Существует несколько вариантов применения растворов нингидрина. Большинство из них содержит стабилизирующее окраску вещество. В качестве стабилизаторов применяют соли, содержащие ионы кобальта, меди, никеля, кадмия. Установлено, что продукт взаимодействия аминокислоты с нингидрином реагирует с ионами металлов, образуя устойчивое красно-оранжевое соединение [646].

При *качественном определении* аминокислот хроматограммы проявляют 0,2 — 0,25%-ным раствором нингидрина в ацетоне или бутиловом спирте с дальнейшей экспозицией в течение 24 ч в темноте (или хроматограммы помещают на 5—10 мин в термостат при температуре 80—90° С), а затем фиксируют спиртовым раствором азотной кислоты меди (к 1 мл насыщенного раствора $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ добавляют 0,2 мл 10%-ного раствора HNO_3 и доводят до 100 мл 95%-ным этиловым спиртом).

Для *количественного определения* аминокислот используют нингидриновый проявитель следующего состава: 95 частей 0,5%-ного раствора нингидрина в ацетоне смешивают с 1 частью ледяной уксусной кислоты и 4 частями воды [439]. Хроматограммы высушивают на воздухе, а затем помещают для полного проявления в темноту на 24 ч (преимуществом такого проявления является чистый фон хроматограмм). Пятна, проявленные раствором нингидрина, элюируют метиловым

спиртом, 50%-ным этанолом, содержащим 0,025 М фосфатный буфер (рН 7,0) [745], 60%-ным этанолом, 75%-ным этанолом, содержащим CuSO_4 .

VI.1.3. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Перед нанесением на бумагу исследуемый материал должен быть соответствующим образом подготовлен. Подготовка сводится главным образом к удалению из биологических проб примеси солей и белков, а из белкового гидролизата — кислот.

VI.1.3.1. ЭКСТРАКЦИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ МИЦЕЛИЯ

Для экстрагирования свободных аминокислот из грибного материала необходимо отфильтровать мицелий от культуральной жидкости. Культуральную жидкость центрифугируют при 3000 об/мин. Мицелий тщательно промывают, излишек воды отсасывают на Бюхнеровской воронке. Часть мицелия используют для определения влажности, другую — для извлечения свободных аминокислот. Извлекают аминокислоты из мицелия 80%-ным водным этанолом либо 20%-ным раствором ТХУ или горячей водой (табл. 15). Однако извлечение аминокислот

Таблица 15. Методы экстракции свободных внутриклеточных аминокислот *Fusarium moniliforme*

Экстрагирующее вещество	Количество свободных внутриклеточных аминокислот (мг аминокислотного азота на 1 г сухой массы мицелия)
80%-ный этанол	3,4
20%-ная ТХУ	3,8
Горячая вода	3,2

ТХУ имеет существенный недостаток — при хроматографии экстрактов на бумаге возникают окрашенные в желтый цвет «хроматографические хвосты». В отличие от спиртовых экстрактов водные не требуют дополнительной обработки для освобождения от липидов [18, 772].

Навеску мицелия заливают дистиллированной водой и экстрагируют в течение 10 мин на кипящей водяной бане. Мицелий отделяют центрифугированием или фильтрацией. В фильтрат добавляют тройной объем этанола и несколько капель ледяной уксусной кислоты. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием, надосадочную

жидкость упаривают на водяной бане досуха, а сухой остаток смывают 10%-ным водным раствором изопропилового спирта (температура экстракта при выпаривании не должна превышать 50° С). Полученные изопропиловые экстракты используют для хроматографии. Положительной стороной этого метода является отсутствие в экстрактах пептидов. Для определения наличия пептидов и водорастворимых белков, оставшихся после осаждения спиртом, экстракты гидролизуют 6 н. HCl . По разнице содержания α -аминоазота в экстракте до и после гидролиза определяют наличие или отсутствие белков и пептидов.

При извлечении аминокислот спиртом навеску сухого материала заливают десятикратным количеством 75—80%-ного водного этанола,

доводят до кипения и оставляют экстракт в спирте на ночь. Экстракцию проводят трехкратно. Затем материал промывают этанолом. Экстракты и смывной этанол объединяют, упаривают до сухого остатка в фарфоровых чашках на водяной бане с вентилятором или в вакуум-эксикаторе при комнатной температуре. Кроме аминокислот в спиртовой экстракт переходят сахара, пигменты, многие минеральные вещества и т. д., поэтому перед хроматографированием необходимо очищать экстракт. Для очистки экстракт пропускают через ионообменник. Сухой остаток аминокислот растворяют в 1—2 мл 10%-ного подкисленного соляной кислотой изопропилового спирта. В замороженном виде экстракты можно хранить в холодильнике в течение нескольких недель.

VI.1.3.2. СВЯЗАННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ МИЦЕЛИЯ

Для определения аминокислот, содержащихся в белках мицелия, последние должны быть предварительно гидролизованы. В мицелии микроскопических грибов помимо белков содержится значительное количество других веществ, в частности моонуклеотиды, свободные аминокислоты, липиды и т. д. Перед гидролизом белка их необходимо удалить из мицелия как балластные вещества. Для освобождения от свободных аминокислот мицелий тщательно растирают пестиком в ступке со стеклянным песком, затем на холоде заливают пятнадцатикратным объемом 5%-ного раствора ТХУ. Взвесь мицелия в растворе ТХУ вновь центрифугируют для удаления свободных аминокислот, осадок дважды промывают охлажденной водой.

Мицелий гидролизуют в запаянной ампуле в 6 н. растворе HCl 24 ч при 105—120° С (2 мл HCl на 100 мг мицелия). По окончании гидролиза гумины отфильтровывают. Соляную кислоту удаляют многократным выпариванием под вакуумом. Гидролизаты обессаливают. Для этого их упаривают в фарфоровых чашках на водяной бане до консистенции сиропа. Остаток растворяют в 96%-ном подкисленном этаноле (0,5 мл концентрированной HCl на 100 мл спирта) и хранят в течение 12 ч в холодильнике. Аминокислоты переходят в раствор, а балластные вещества остаются в осадке. Осадок удаляют центрифугированием, а раствор вновь упаривают, растворяют в подкисленном спирте и выдерживают в холодильнике в течение 1—1,5 ч. Такую операцию повторяют трижды. Для удаления липидов гидролизат взбалтывают несколько раз в делительной воронке с этиловым эфиром. Затем гидролизат упаривают на водяной бане до необходимого объема, определяемого по содержанию в нем аминного азота. Культуральную жидкость упаривают и оставшийся после экстракции свободных аминокислот осадок гидролизуют.

Метод предварительного фракционирования белковых гидролизатов на ионообменных смолах на моно- и диаминокислоты не применяют, так как он больше подходит для препаративного выделения, чем для сравнительного количественного анализа, когда для получения воспроизводимых результатов крайне желательно соблюдение одинаковых условий опыта при всех определениях.

VI.1.3.3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ФРАКЦИИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Для извлечения аминокислот из культуральной жидкости нативный раствор выпаривают досуха в фарфоровой чашке на водяной бане. После этого добавляют подкисленный этанол и сухой остаток тщательно

растирают в ступке [505]. Эту операцию повторяют трижды. Фракции собирают вместе, фильтруют и снова выпаривают досуха. К остатку приливают 1 мл 10%-ного изопропилового спирта и экстрагируют аминокислоты. Для хроматографии используют прозрачный раствор коричнево-бурого цвета.

Очистку экстрактов аминокислот проводят на отечественном катионите КУ-2 [396], а также на импортных ионообменниках Дауэкс-50, Зео-Карб-215 и др. Ионообменники, или ионообменные смолы, являются синтетическими адсорбентами, способными к обменному поглощению катионов или анионов. В соответствии с этим все ионообменники делят на катиониты и аниониты. Перед использованием ионообменники необходимо активировать. Для этого 5—10 г ионообменника встряхивают в течение 1—2 ч с 200—300 мл 1 н. HCl, после чего на фильтре отмывают от кислоты дистиллированной водой до нейтральной реакции. В результате такой обработки катионит насыщается H^+ -ионами. Затем ионообменник взбалтывают с водой и переносят в хроматографическую колонку $(20—25) \times (1—1,5)$ см, в нижнюю узкую часть которой вставляют небольшой тампон из стеклянной ваты. Необходимо следить, чтобы в колонке между частицами ионообменника не было воздуха; на поверхности ионообменника в колонке должен находиться слой воды или раствора.

Полученный раствор аминокислот разбавляют водой до объема 50 мл и пропускают через хроматографическую колонку со скоростью 1 мл/мин. При пропускании раствора электронейтральные молекулы (сахара и пр.) и анионы в колонке не задерживаются, аминокислоты и катионы адсорбируются ионообменником, обмениваясь на H^+ -ионы. Колонку промывают 30—40 мл дистиллированной воды, которую затем удаляют и приступают к элюированию аминокислот. Аминокислоты элюируют, пропуская через колонку 50 мл 6 н. NH_4OH со скоростью около 1 мл/мин. Затем колонку промывают 20—30 мл воды. Раствор аминокислот упаривают в вакууме или на бане, добавляя 15—20 мл воды, и снова выпаривают для удаления следов аммиака. Выпаривание (лучше в вакууме) проводят трижды [197, 359, 396]. После удаления воды и следов аммиака сухой остаток аминокислот растворяют в подкисленном HCl 10%-ном изопропиловом спирте и хроматографируют.

VI.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА

Аминный азот определяют нингидриновым методом [608]. В мерные колбочки на 50 мл к 1 мл культуральной жидкости или экстракта мицелия прибавляют 1 мл 2%-ного водного раствора нингидрина и 1 мл 10%-ного водного раствора пиридина (перегнанного), перемешивают и ставят на 20 мин на кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают, доводят дистиллированной водой до метки и полученные образцы синего цвета колориметрируют на ФЭК-56 с зеленым светофильтром. Содержание аминного азота рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по лейцину, и выражают в абсолютных единицах на 1 мл культуральной жидкости и в относительных — на единицу сухого вещества.

Существуют и другие методы определения аминного азота: метод Ван-Сляйка, медный способ [359], метод титрования [743] и др.

VI.1.5. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В настоящее время хроматография на бумаге широко используется не только для качественной идентификации различных соединений, но и для количественного анализа. Количественное определение аминокислот основано на измерении оптической плотности Си-производного ДИДА после вымывания его из бумаги. Линейная зависимость между содержанием аминокислоты в пятне и оптической плотностью раствора наблюдается при содержании аминокислоты 0,025—0,25 мкмоль (оптимальные концентрации 0,05—0,20 мкмоль). Точность метода $\pm 5\%$.

VI.1.5.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

После пропускания растворителя хроматограммы высушивают в чистом вытяжном шкафу при комнатной температуре, затем удаляют избыток растворителя и погружают на несколько секунд в 0,5%-ный раствор нингидрина, приготовленный по прописи, указанной в разделе VI.1.2.7; высушивают в темноте до исчезновения запаха уксусной кислоты. После этого хроматограммы помещают на 15—20 мин в сушильный шкаф при температуре 60° — 80° С до полного развития окраски. Вырезают участки хроматограммы с ярко-лиловыми пятнами аминокислот, у края хроматограммы вырезают контрольные участки, равные по площади опытным. Вырезанные участки бумаги измельчают ножницами и помещают в пробирки для элюирования. Элюцию проводят в водном растворе этилового спирта (1 : 1) с добавлением 0,5 мл 0,05%-ного раствора CuSO_4 в 75%-ном этиловом спирте. Лиловая окраска аминокислот переходит в оранжево-красную вследствие образования Си-производного ДИДА. Последнее соединение растворимо в 75%-ном этиловом спирте, в связи с чем при данной операции совмещается образование комплексного соединения с медью и его экстракция. Пробирки помещают в затемненный бокс на 1 ч и периодически сильно встряхивают [165, 220].

Опытные пробы фотометрируют против контрольной в ФЭКе с зеленым светофильтром (ФЭК-56 — 583 нм; ФЭК-М — 540 нм); пересчет показаний ФЭКа проводят по калибровочной кривой с растворами чистых аминокислот [285, 359]. Для построения калибровочных кривых готовят 0,01 М растворы аминокислот, содержащие в 1 мкл 0,01 мкМ каждой аминокислоты. Количество аминокислоты, соответствующее 10 мл 0,01 М раствора, отвешивают на аналитических весах и растворяют в воде или в 10%-ном изопропиловом спирте. Раствор тирозина подкисляют 0,1 н. раствором HCl до полного растворения. Микропипеткой наносят на бумагу 5, 10, 15 и 20 мкл 0,01 М раствора аминокислоты порциями по 5 мкл с таким расчетом, чтобы каждая точка будущего калибровочного графика соответствовала 0,05; 0,10; 0,15 и 0,20 мкМ аминокислоты. Установлено, что оптимальными являются 20—30 мкг аминокислоты; в этих пределах показания прибора находятся в линейной зависимости от концентрации окрашенных нингидриновых комплексов аминокислот.

Содержание аминокислот выражают обычно в процентах к массе белка или смеси свободных аминокислот либо в процентах азота каждой аминокислоты к азоту всего гидролизата или смеси. Выше указывалось, что точность определения большинства аминокислот

составляет $\pm 5\%$, а для трудно разделяемых аминокислот (серин, глицин, валин, метионин) $\pm 10\%$ [164, 407, 590, 743].

Некоторые аминокислоты нельзя определить приведенными методами: цистин и триптофан разрушаются при кислотном гидролизе. Пролин не содержит аминогруппы, являясь иминокислотой, и дает с нингидрином желтую окраску. Для количественного определения этих аминокислот используют специфические химические реакции.

VI.1.5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЛИНА

Для определения пролина готовят нингидриновый реактив, содержащий 40 мл 6 М раствора H_3PO_4 , 60 мл ледяной уксусной кислоты и 2,5 мг нингидрина на каждые 100 мл смеси. Для растворения нингидрина смесь нагревают до $70^\circ C$ на водяной бане. Хроматограммы обрабатывают 0,02%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Окрашенные пятна вырезают из хроматограммы и помещают в пробирки. В эти же пробирки добавляют по 1 мл 0,1 н. раствора NaOH и содержимое высушивают в вакууме в течение ночи. После этого в пробирки вливают по 1 мл уксусной кислоты и по 1 мл нингидринового реактива. Содержимое пробирок прогревают на водяной бане при $100^\circ C$ в течение 1 ч, добавляют по 1 мл уксусной кислоты и охлаждают до комнатной температуры. После этого розовую жидкость переносят в другие пробирки и остатки пигмента экстрагируют из бумаги ледяной уксусной кислотой. Общий объем жидкости доводят до определенного объема (5—10 мл в зависимости от содержания пролина в исследуемых образцах). Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при 515 нм или на ФЭК-М с синим светофильтром. После подогревания пробирок устойчивая розовая окраска сохраняется лишь в течение часа, поэтому колориметрирование необходимо проводить в течение этого времени [359]. Пролин определяют также методом Швита [771].

VI.1.5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТИОНИНА

Метионин определяют методом Салливана-Мак-Карти [693]. К испытуемому раствору (1—7,5 мл), содержащему 0,2—1,0 мг метионина, добавляют 1,5 мл 5 н. NaOH, 1,5 мл 1%-ного раствора глицина и 0,3 мл 10%-ного (масса/объем) раствора нитропруссид натрия (соль растирают в ступке и растворяют в воде при комнатной температуре). После добавления каждого реагента раствор перемешивают, помещают на водяную баню при $37—40^\circ C$ на 15 мин, охлаждают на льду в течение 5—7 мин, затем в каждую пробирку добавляют по 3,0 мл 6 н. раствора HCl. Кислоту приливают по стенке пробирки, не перемешивая. Пробирки закрывают пробками, помещают в штатив, встряхивают в течение 1 мин и оставляют стоять при комнатной температуре 15 мин. Измеряют интенсивность окраски против воды, используя фильтр 520 нм. Одновременно готовят контроль на реагенты. Если исследуемая жидкость окрашена, то к ней добавляют все реагенты, кроме нитропруссид, измеряют интенсивность окраски контроля и исследуемой пробы против воды, а затем из значений оптической плотности исследуемого раствора вычитают обе поправки.

VI.1.5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПТОФАНА

Триптофан при гидролизе белка 6 н. раствором HCl полностью разрушается, поэтому его определяют методом Фюрта и Дише [142], разрушая белок с помощью щелочи. К 2 мл раствора, содержащего

около 2 мг белка в 30%-ном растворе КОН, добавляют несколько капель 2,5%-ного раствора формальдегида и 15 мл чистой НСl. Перемешивают, оставляют на 10 мин, добавляют 10 капель 0,55%-ного раствора нитрита натрия и доводят объем раствора до 20 мл концентрированной НСl. После фильтрации раствора через бумажный фильтр определяют количество триптофана по интенсивности окраски на ФЭКе. Чтобы удостовериться в максимальном развитии окраски, добавляют еще несколько капель раствора нитрита натрия.

Триптофан определяют также методом Хорна [415], который позволяет определять содержание триптофана непосредственно в навеске нативного белка (без гидролиза). Метод заключается в следующем: к 0,5 мл раствора, содержащего 5—7 мг белка, добавляют 1 мл воды и 0,5 мл 5%-ного раствора *n*-диметиламинобензальдегида в концентрированной НСl и 5 мл концентрированной НСl. Смесь сразу же приобретает розовую окраску. Через 5 мин после выдержки при комнатной температуре добавляют 1 каплю 0,2%-ного раствора NaNO_2 , смесь перемешивают и фотометрируют при 650 нм (после добавления нитрита проба приобретает синий цвет). Окраска стабильна в течение часа. Количество триптофана рассчитывают по калибровочной кривой.

Описанный метод определения аминокислот вполне применим для определения содержания аминокислот у микроскопических грибов, актиномицетов и других микроорганизмов. Метод особенно удобен для получения сравнительных данных о наличии аминокислот у микроорганизмов разных таксономических групп.

Четкое разделение аминокислот на хроматограммах в значительной мере зависит от качества бумаги, чистоты употребляемых реактивов, условий хроматографии, наличия примесей в исследуемых экстрактах и других факторов (схема).

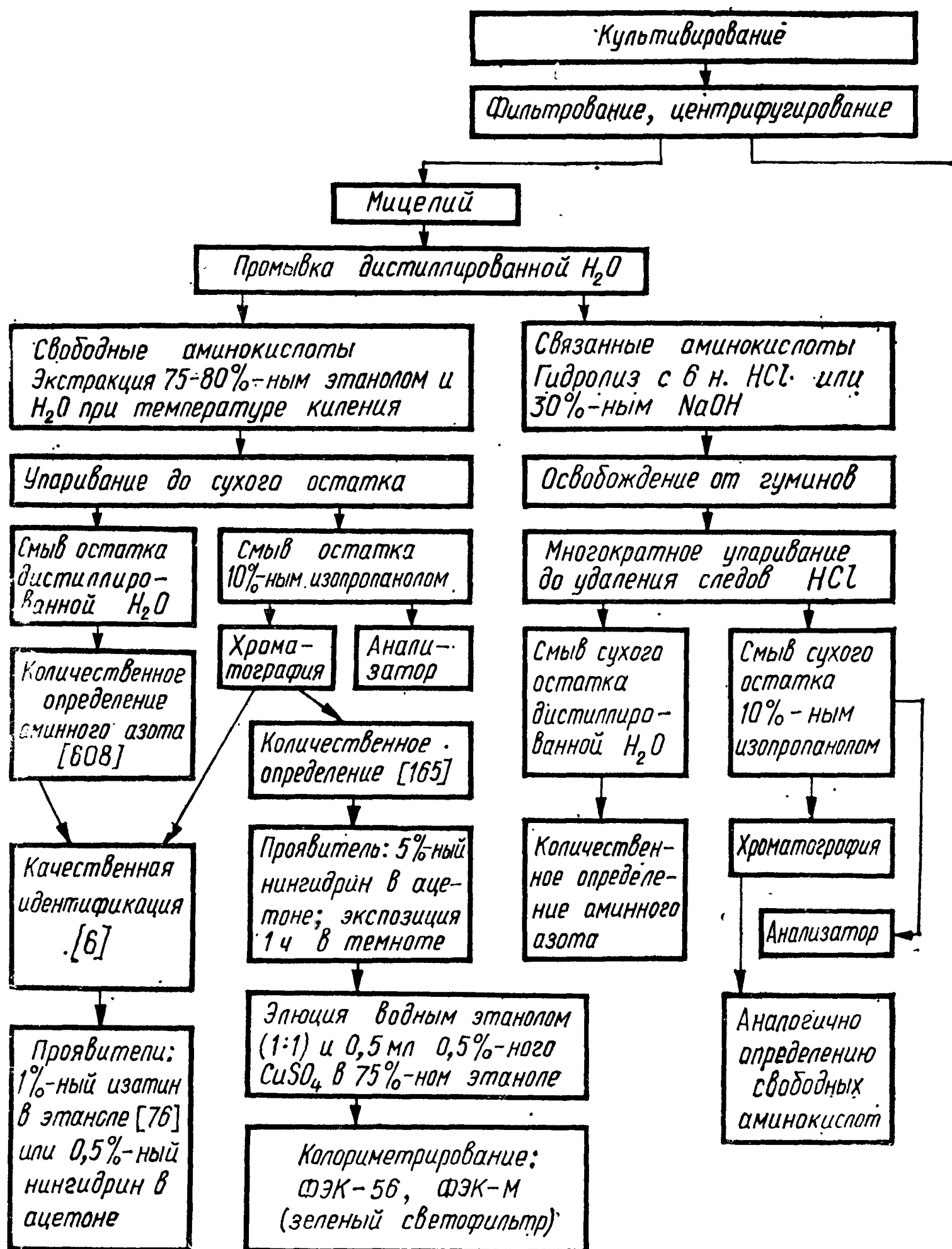
VI.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ [207, 467, 475, 513, 539, 560, 599, 695]

Существуют разные методы определения белка: рентгеноструктурный метод определения концевых групп, ультрацентрифужное фракционирование, метод изотопов, электрофорез, хроматографические и оптические методы. Ультрацентрифужирование и электрофорез основаны на наложении силового и электрического полей, под действием которых белки соответствующим образом распределяются между различными участками одной фазы. Хроматографические методы основаны на неодинаковой способности различных соединений к адсорбции.

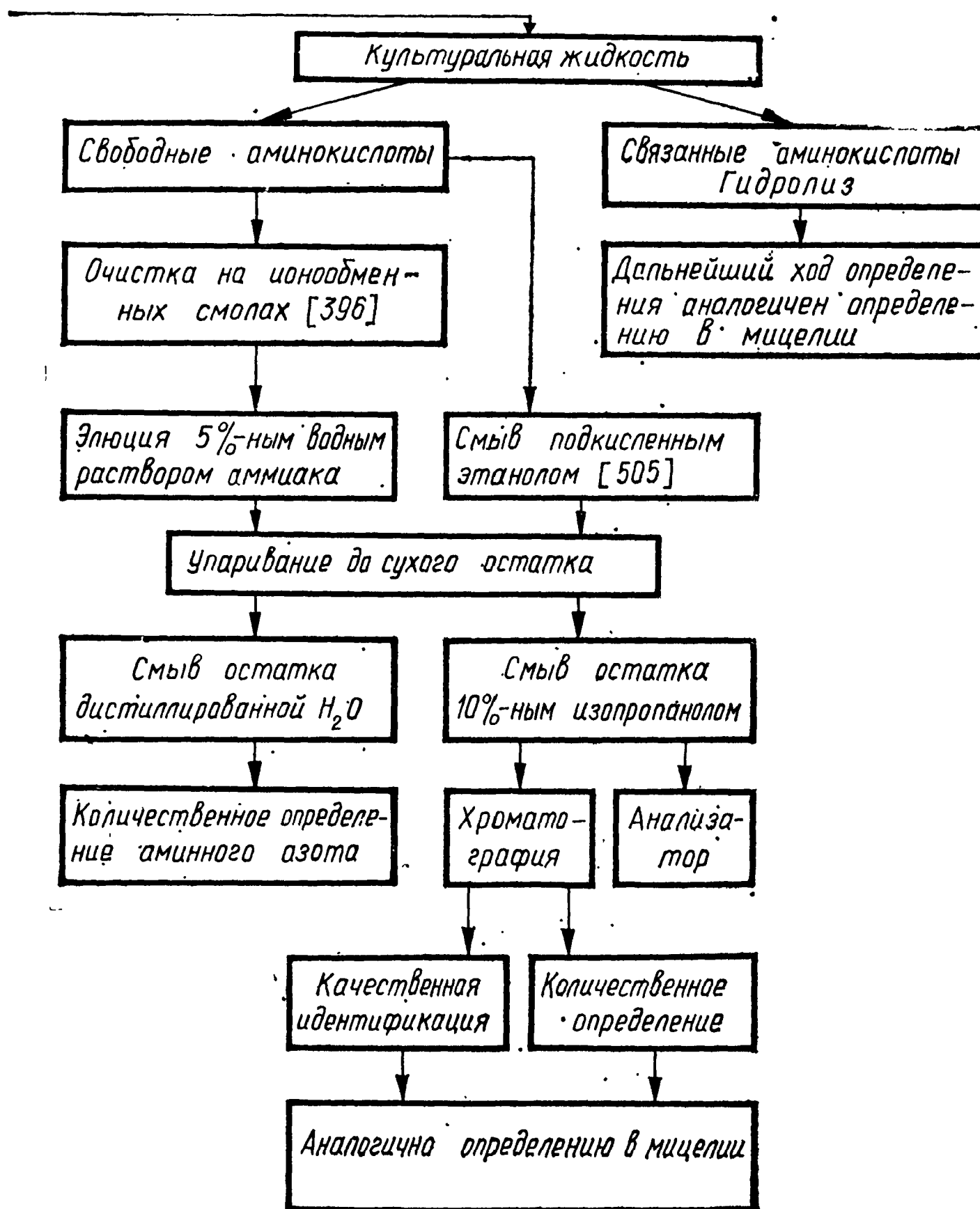
VI.2.1. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В качестве адсорбента используют гидроксипатит. Навеску (3 г) адсорбента суспендируют в течение 5 ч с 20 мл дистиллированной воды. Затем суспензию переносят на предварительно обезжиренную стеклянную пластинку ($7,5 \times 1,5$ см, толщина 2 мм). Перед нанесением адсорбента пластинку помещают в ванночку, которую устанавливают на столик в горизонтальном положении, и высушивают на воздухе в течение суток при комнатной температуре. Растворы белка (не более 100—200 мкг белка) наносят на узкую сторону подсушенной пластинки на расстоянии 1,5 см от края. Пластинку с адсорбентом и белком помещают в сосуд, на дно которого наливают элюирующий раствор — 10 мл

Схема качественного и количественного определения свободных гри



и связанных аминокислот в мицелии и культуральной жидкости
бсв



фосфатного буфера (0,15 М, рН 6,8). Пластинку устанавливают под углом 75°, так, чтобы сторона с нанесенным белком оказалась внизу; сосуд закрывают крышкой. Когда элюирующий фосфатный буферный раствор, поднимаясь по пластинке с адсорбентом, достигает верхнего края пластинки, ее вынимают из сосуда, сушат при комнатной температуре, опрыскивают 1%-ным раствором нингидрина и проявляют [207, 599, 695].

VI.2.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ [661, 832]

Явление электрофореза основано на движении в электрическом поле сравнительно небольших частиц суспензии или коллоидных растворов. Скорость движения ионов повышается с увеличением электрического заряда e и силы электрического поля i , однако не уменьшается с увеличением радиуса r движущихся частичек и повышением межмолекулярного трения или вязкости среды η . Скорость движения заряженных частиц сферической формы определяют уравнением $v = ei/6\pi r\eta$.

Препаративный и количественный электрофорез применяют соответственно для разделения смеси веществ и их количественного определения после разделения. Методом электрофореза удобно фракционировать антибиотики, бактериальные антигены, белки, витамины, полисахариды, фосфорные эфиры и другие вещества. Различают несколько видов электрофореза: зональный, фронтальный, микроскопический и иммунофорез.

Зональный электрофорез проводят в порах твердого вещества. Этот метод удобен благодаря простоте аппаратуры, высокой скорости и хорошему качеству разделения, возможности разделять различные классы веществ, способных ионизироваться в водной среде. Однако при применении этого метода возникают некоторые трудности: адсорбция исследуемого вещества на границе раздела фаз, электрофоретическое движение раствора в порах, неоднородность поддерживающей среды.

С помощью *фронтального* электрофореза измеряют скорость движения границы раздела фаз белкового раствора и его растворителей, определяют подвижность и изоэлектрическую точку белков с очень высокой точностью. Метод применяют для определения гомогенности индивидуальных белков и разделения смеси белков. Однако фронтальный электрофорез не позволяет проводить препаративное разделение смеси, потому что в чистом виде можно выделить только самый быстрый и самый медленный компоненты.

Микроскопическим электрофорезом разделяют суспензии, наблюдают перемещение частиц между электродами и измеряют скорость их движения. Этот метод не применяют широко для электрофореза белков, так как ультрамикроскопию и микроскопию невозможно использовать для наблюдения за белковыми частицами.

С помощью *иммуноэлектрофореза* определяют число компонентов смеси и идентифицируют эти компоненты по их электрофоретической подвижности, иммунохимической специфичности, химической природе или другим свойствам. Этим методом можно выявить только те компоненты, которые способны давать реакцию преципитации с антителами. Благодаря специфичности реакции преципитации можно различить вещества с одинаковой электрофоретической подвижностью. Высокая чувствительность этого метода позволяет определять вещества в очень малых концентрациях.

В качестве носителей в электрофорезе используют ватмановскую бумагу, агаровый и крахмальный гели, полиакриламид. *Электрофорез на бумаге* применяют для исследования низкомолекулярных веществ и пептидов. Аппаратура и все операции очень просты. Анализ проводят на поверхности бумаги по специфической окраске зон, их ферментативной активности, радиоактивности. Недостаток метода — значительная адсорбция и денатурация белка. Смещение зон в носителе зависит от скорости движения буферного раствора, силы тяготения, уровня буферного раствора в электродном сосуде, испарения раствора с поверхности носителя. Значительный недостаток метода — невозможность прямого фотометрического анализа для количественного определения фракций.

Более удобен *электрофорез в гелях*. Можно изготавливать гели с разным размером пор в зависимости от целей исследования. В этих условиях подвижность белковых молекул зависит от их размеров. Адсорбция во многих гелях незначительна. Гели отличаются от жидких сред большей вязкостью и более высоким сопротивлением, что позволяет разделять сложные белковые смеси. Электрофорез в гелях используют обычно с аналитической целью, а для количественного определения компонентов смеси применяют метод прямого фотометрирования после предварительной окраски на поверхности геля.

Гели готовят из агар-агара, крахмала и полиакриламида. Агар-агаровый гель удобен благодаря возможности приготовления из него пластин различной формы и толщины, пластичности при подогреве и плотной консистенции при комнатной температуре. Недостатком агар-агарового геля являются входящие в его состав полисахариды, образующие комплексы со щелочными белками и некоторыми липопротеидами.

Крахмальный гель в отличие от агарового обладает свойствами «молекулярного сита» что позволяет разделять смеси биополимеров не только по величине электрического заряда, но и по размерам молекул. Крахмальный гель используют для идентификации гемоглобинов, изоферментов, наследственно детерминированных белков. Недостаток метода — непрозрачность геля, что усложняет идентификацию и количественное определение отдельных фракций.

Наиболее чувствительный метод — электрофорез в полиакриламидном геле — синтетическом полимере из веществ определенной химической структуры и высокой степени чистоты. Размеры пор полиакриламидного геля можно широко варьировать, изменяя его концентрацию от 2 до 30%. Гель прозрачен.

VI.2.2.1. ПОДГОТОВКА МИЦЕЛИЯ

Для разрушения мицелия грибов используют шок-трубку [573]. Мицелий отфильтровывают и трижды промывают холодной дистиллированной водой. 1 г сырого мицелия помещают в 9 мл охлажденного 0,67 М фосфатного буфера (рН 7,0) и интенсивно встряхивают со стеклянными бусинками при 35° С 30 мин. Суспензию центрифугируют при 25 тыс. об/мин в течение 30 мин. Пробы белка (0,04 мг) подвергают электрофорезу. Общее содержание белка определяют методом Лоури [121, 222, 678] или Беннета [512].

VI.2.2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ

Мединал-вероналовый буфер; рН 8,6 (10,32 г мединала и 1,84 г веронала на 1 л воды); Трис-буфер, рН 8,9 (10,082 г трис-гидрооксиметиламинометана, 1,307 г динатрийэтилендиаминотетраацетата, 0,787 г

борной кислоты в 1 л воды); щелочной глициновый буферный раствор с ионной силой 0,07 и рН 8,8. Для электрофореза в крахмальном геле используют буферный раствор, содержащий 0,03 М H_3BO_3 и 0,012 М NaOH .

VI.2.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ

Бумагу смачивают буферным раствором и помещают на другой лист фильтровальной бумаги для удаления избытка жидкости. Затем переносят ее в аппарат на обработанную силиконом полированную стеклянную пластинку, не погружая концы бумажной полосы в буферный раствор. Белок наносят круглым пятном с помощью капиллярной пипетки. На бумагу накладывают вторую стеклянную пластинку, концы бумаги погружают в электродные сосуды, бумагу фиксируют. Систему оставляют на несколько минут для установления равновесия, затем включают ток. По окончании опыта полосы бумаги высушивают в сушильном шкафу при 120°C в течение 30 мин. При силе тока около 1 мА и напряжении 120—150 В белок перемещается на 5—7 см примерно за 2,5 ч.

Электрофореграммы окрашивают бромфеноловым синим, помещая их на 10—20 мин в ванну с красителем, затем раствор сливают и электрофореграммы многократно промывают. После окрашивания электрофореграмм видны пятна, соответствующие локализации фракций белков. Для определения соотношения между отдельными фракциями белка электрофореграмму разрезают. Фракции белков экстрагируют, помещая кусочки бумаги в пробирки и добавляя по 5 мл 0,01 н. раствора NaOH . Через 30 мин раствор фотометрируют. Контролем служит элюат чистой полосы бумаги в 5 мл 0,01 н. NaOH .

Лучшие результаты получают при обработке проб другим способом. Если испытуемые вещества не поглощают свет в видимой и ультрафиолетовой частях спектра, то по окончании электрофореза необходимо окрасить препарат. Белки окрашивают водным раствором, содержащим 500 мг бромфенолового синего, 50 г сулемы в 1 л. Бумажные полосы высушивают, погружают в раствор краски на 6 ч при комнатной температуре, избыток краски отмывают дважды 5%-ным раствором уксусной кислоты в течение 5 мин. Электрофореграмму фиксируют раствором, содержащим 50 мл уксусной кислоты и 4 г ацетата натрия в 1 л и высушивают в течение 15 мин. Электрофореграммы с синей окраской анализируют фотометрически. Перед анализом их помещают в камеру с парами аммиака и приступают к фотометрированию спустя 10 мин после обработки. Такой же оттенок приобретают электрофореграммы при погружении в 10%-ный эфирный раствор диэтиламина с последующим высушиванием, причем получившаяся окраска стабильна. Для окрашивания применяют также насыщенный раствор амидо-черного в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 9 : 1. Время окрашивания — 10 мин при постоянном встряхивании.

VI.2.4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

Стеклянные пластинки размером 25×180 мм промывают хромовой (серная кислота и бихромат калия) и спирто-эфирной смесями (1 : 1).

Агаровый гель готовят из 2—4%-ного раствора агара в дистиллированной воде. На стеклянную пластинку микропипеткой наносят

несколько капель по 5 мл растворенного агара, оставляют на 1 ч для образования геля. Затем стеклянные пластинки переносят в камеры. Агаровый гель соединяют с буферным раствором двухслойными полосками хроматографической бумаги. Раствор белка наносят на полоски фильтровальной бумаги размером 2×20 мм. Затем пинцетом переносят их на агаровый гель, размещая по центру, и проводят электрофорез. Белковый раствор переходит из бумаги в гель. Напряжение тока 150—160 В, сила тока 1,3—1,6 мА, время электрофореза 6 ч. После окончания электрофореза пластинку с агаром фиксируют в течение 3 ч, высушивают в термостате при 37° С, окрашивают красителем в течение 18 ч. Окрашенные пластинки промывают трижды 2%-ным раствором уксусной кислоты по 5—10 мин и в течение 2 мин 10%-ным раствором уксусной кислоты с 2%-ным раствором ацетата натрия. Окрашенные и промытые пластинки помещают в термостат при температуре 37—40° С до полного высушивания. Электрофореграммы расшифровывают денситометрически.

VI.2.5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ

Гель готовят нагреванием 100 мл суспензии крахмала (15%-ный раствор) с буферным раствором в круглодонной колбе емкостью 500 мл над пламенем (не допуская кипения) при постоянном вращении до момента образования гомогенного раствора. Этот раствор наливают в пластмассовую кювету и накрывают полиэтиленовой пластинкой с поверхностью, покрытой тонким слоем минерального масла, и оставляют до застывания. Гель помещают в кювету между электродами и делают поперечный разрез лезвием бритвы. В разрез вставляют кусочек фильтровальной бумаги, смоченной испытуемым раствором белка. Электрофорез проводят в течение 6 ч при комнатной температуре; градиент напряжения 6 В/см, что соответствует силе тока 4—5 мА на каждый гель. После окончания электрофореза гель осторожно извлекают из кюветы, помещают на стеклянную пластинку и разрезают лезвием бритвы пополам вдоль горизонтальной поверхности, так как внутри геля зоны локализации белков выявляются наиболее четко. Оба слоя геля быстро разделяют, погружают в насыщенный раствор амидо-черного в смеси метанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 50 : 10 : 50 на 0,5 ч и промывают в трех сменах растворителя. В последней промывной жидкости гель оставляют на 2 ч. Окрашенные гели могут сохраняться 6 мес под слоем растворителя.

Белок микроскопических грибов по своим свойствам близок к растительным белкам, поэтому удобно пользоваться методом электрофореза белков в полиакриламидном геле, описанным Сафоновым и др. [403, 404].

VI.2.6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

В настоящее время широко используют метод электрофореза белков в полиакриламидном геле [121, 129, 247, 379, 403, 404, 418, 560, 835]. Этот метод применяют для разделения белков в целях выяснения морфогенеза грибов [835], их таксономии [606, 700, 831], а также для изучения белков различных органелл клетки [99, 405]. Методом электрофореза исследованы белки аспергиллов [513], фузариев [700],

вертициллов [5], нейроспор [539], пенициллов [513] и других микроорганизмов [122, 475]. Авторы перечисленных работ пользовались разными методиками, что весьма затрудняет анализ этих данных в сравнительном аспекте.

Разделение белков в полиакриламидном геле с помощью метода и реактивов фирмы «Реанал» [418]. При применении этого метода можно использовать любые буферные системы и разные концентрации геля.

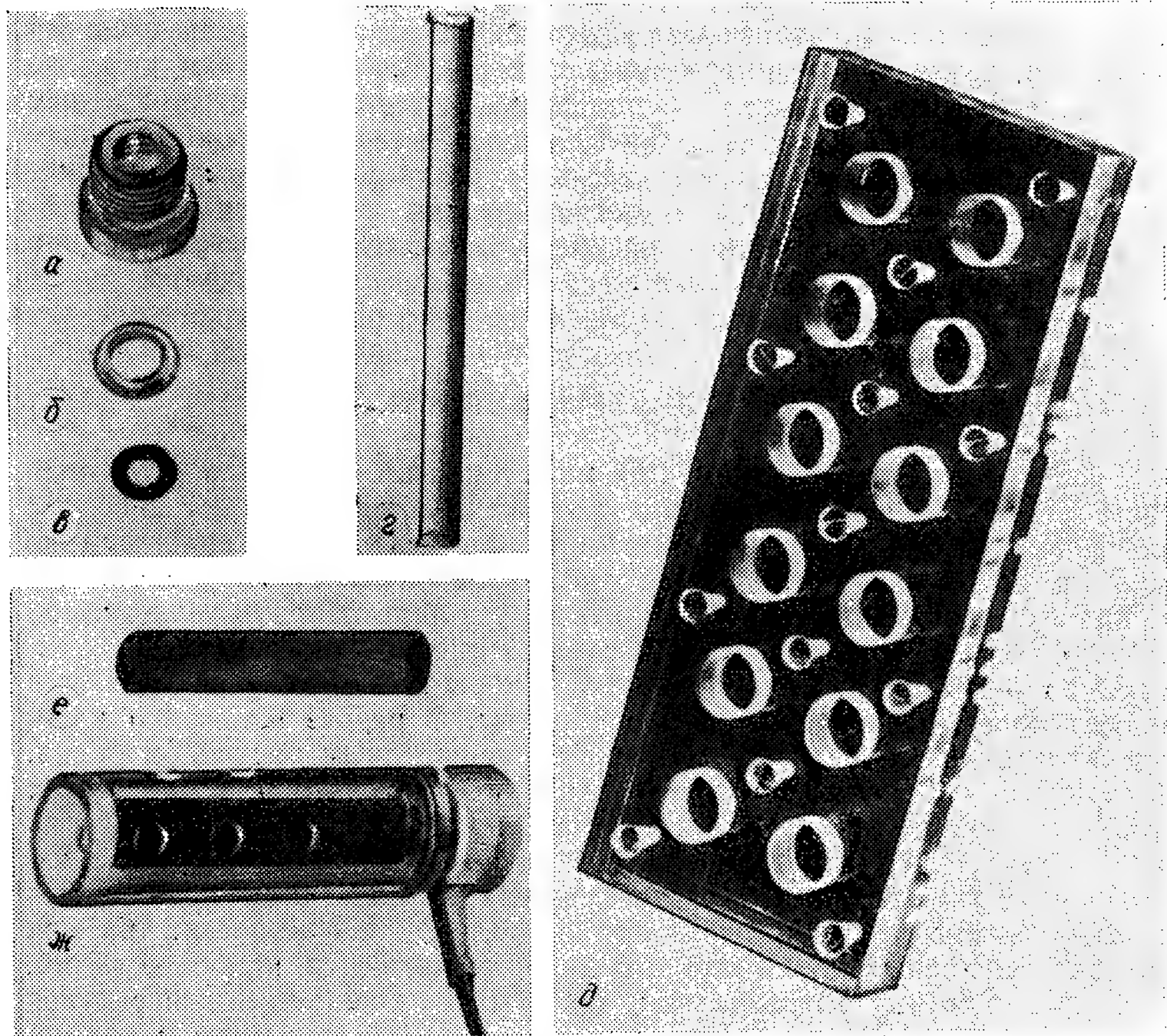


Рис. 96. Основные детали прибора для электрофореза в полиакриламидном геле:

а — зажимное кольцо с резьбой; *б* — конусное кольцо; *в* — резиновое кольцо-прокладка; *г* — стеклянная трубочка для полимеризации геля и последующего электрофореза; *д* — подставка из оргстекла; *е* — угольные электроды; *ж* — плексигласовые держатели электродов.

Метод позволяет анализировать гомогенность белков, определять молекулярную массу, структуру, изучать процессы превращения, разделения и фракционирования белков клетки и ее структур.

Заранее приготовленные и хранящиеся в холодильнике реактивы (см. приложение 5) перед работой выдерживают некоторое время для нагревания до комнатной температуры. Для полимеризации геля и электрофореза используют стеклянные трубочки (рис. 96, *г*) с отшлифованными концами, с внутренним диаметром 6 и длиной 100 мм. На дно трубочек надевают резиновое кольцо-прокладку (рис. 96, *в*), на противоположный конец — конусное кольцо (рис. 96, *б*) и зажимное коль-

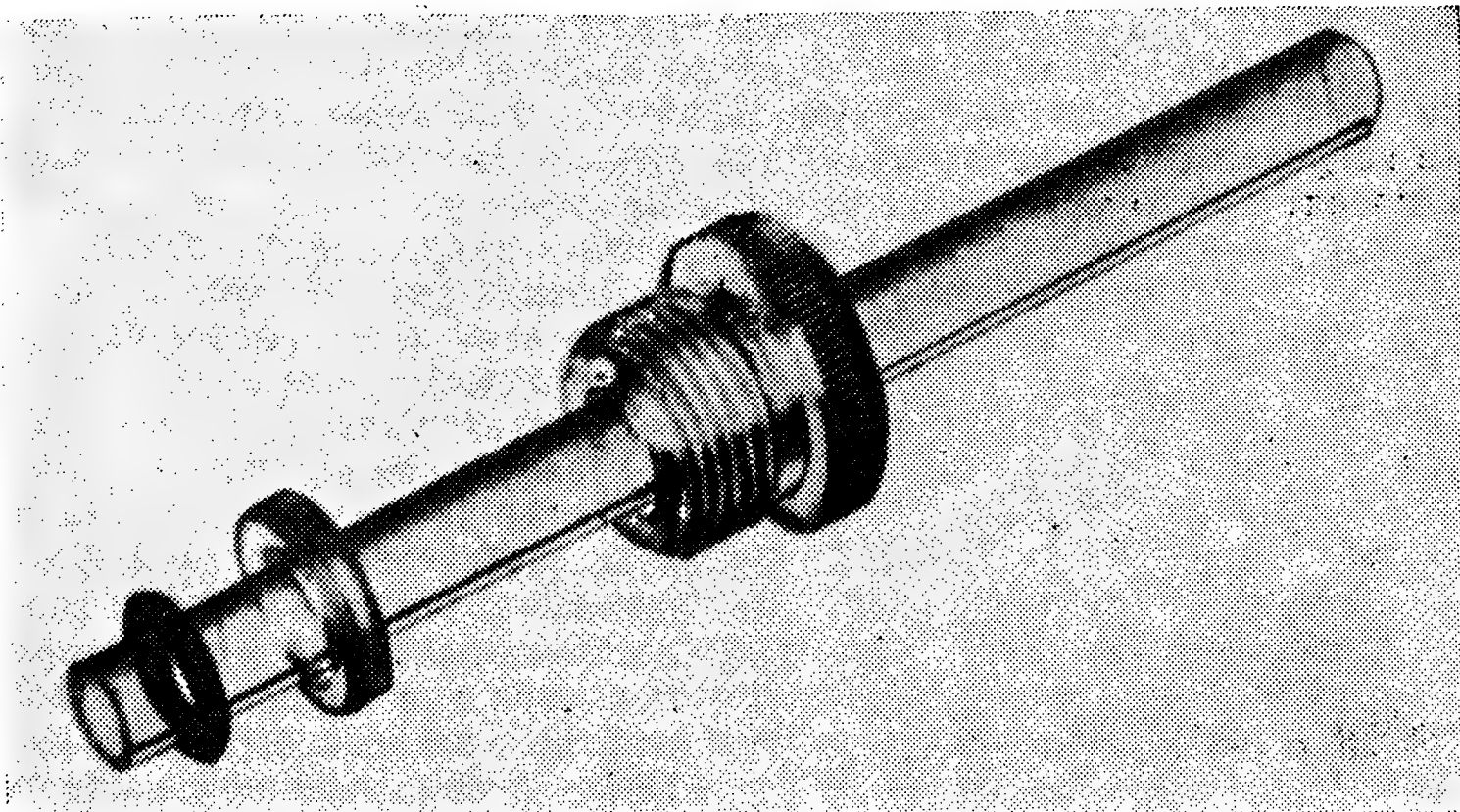


Рис. 97. Подготовленная к работе стеклянная трубочка.

цо с резьбой (рис. 96, а). Собранные колонки укрепляют в углублениях подставки из органического стекла (рис. 96, д). Резиновое кольцо-прокладка плотно зажимается между поверхностями подставки и конусного кольца, предотвращая утечку жидкости.

Готовят раствор мелкопористого геля задаваемой пористости и рН буферной системы. Основные растворы хорошо смешивают в колбе Бунзена (1 объем смеси $1_{\text{щ}}$ и 1 объем раствора $2_{\text{щ}}$, а также 1 объем смеси $1_{\text{к}}$ и 1 объем раствора $2_{\text{к}}$; см. приложение 5). Растворенный воздух удаляют вакуумом, чтобы избежать образования воздушных пузырьков в процессе полимеризации, что в значительной мере препятствует электрофорезу.

В стеклянные трубочки (рис. 96, г) вносят пипеткой по 2 мл раствора мелкопористого геля, на поверхность этого раствора наслаивают 0,2—0,3 мл деминерализованной воды или раствора А, разбавленного в 7—8 раз (наслаивание раствора или воды — одна из критических операций при приготовлении геля, от которой зависит качество электрофореграммы). Через 30—40 мин полимеризация акриламида завершается. Об этом судят по слабому нагреванию стеклянных трубочек и по образованию хорошо видимой границы

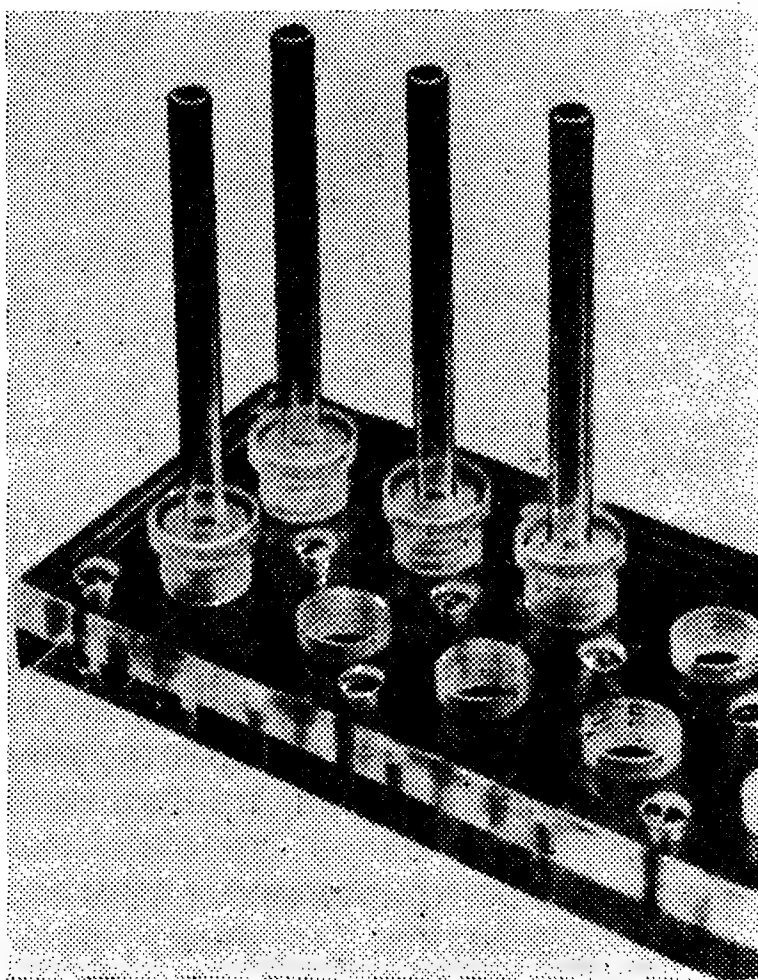


Рис. 98. Подставка с ввинченными стеклянными трубочками для полимеризации геля.

раздела между гелем и наслоенным раствором. Быстрым движением руки осторожно стряхивают с геля наслоенный раствор. После образования геля исчезает необходимость в резиновых кольцах-прокладках и в конусных кольцах. В дальнейшем стеклянные трубочки в подставке крепят только зажимными кольцами, которые на 1—1,5 мм больше внешнего диаметра стеклянной трубочки (рис. 97, 98).

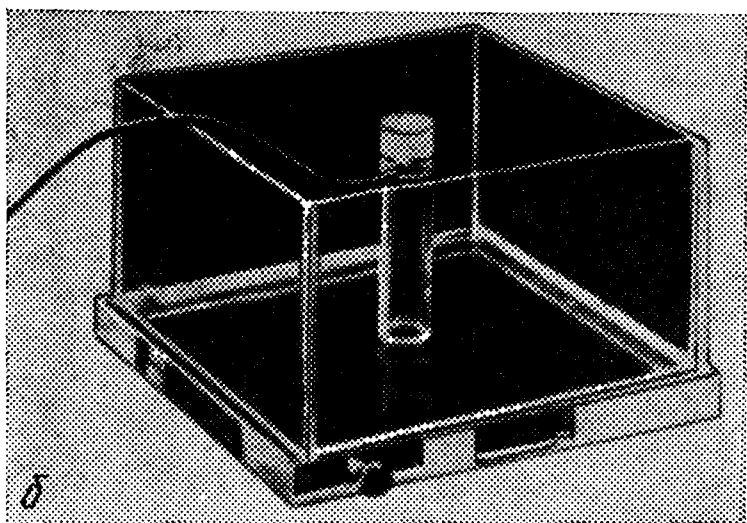
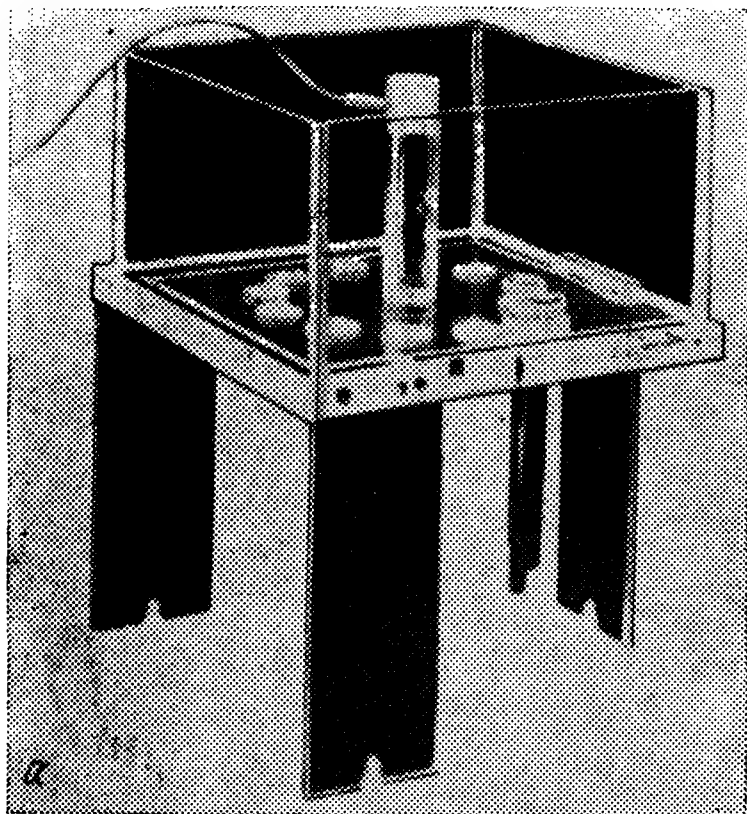


Рис. 99. Прибор для электрофореза в полиакриламидном геле:

а — верхний; *б* — нижний буферный резервуары.

желто-зеленого цвета в опаловый, а конец — по резкому отделению геля от наслоенной жидкости. По окончании полимеризации наслоенную жидкость сливают с геля и ополаскивают гелевые трубочки раствором крупнопористого геля, заранее приготовленного для анализа. Раствор белка смешивают с раствором крупнопористого мономера в соотношении 1 : 2. Такой состав гарантирует отличную полимеризацию геля-образца (sample). При приготовлении раствора геля-образца надо учитывать, что в одной колонке можно разделить 200—250 мкг белка. Более концентрированные растворы белка необходимо разбавлять перед смешиванием (например, раствором крупнопористого геля). Если тестируемый раствор содержит вещества, подавляющие полимеризацию, то его следует разбавлять в 8 раз смесью растворов А и Б (1 : 1).

Приготовленные описанным выше методом гели-образцы наносят на гелевые колонки пипеткой (по 0,2 мл). Эта часть гелевой колонки при последующем электрофорезе непосредственно соприкасается с

Готовят раствор крупнопористого геля. Отсос воздуха не обязателен, однако следует предохранять раствор от воздействия света из-за присутствия чувствительного к нему рибофлавина. Стеклянные трубочки ополаскивают 0,1—0,2 мл раствора мономера для полного удаления остатков наслоенного раствора. После ополаскивания в каждую колонку пипеткой вносят по 0,2 мл крупнопористого геля, затем наслаивают 0,1—0,2 мл деминерализованной воды. Наслаивание в данном случае играет такую же роль, как и в случае мелкопористого геля. Крупнопористый диск, непосредственно соприкасающийся с мелкопористым гелем, играет роль промежуточного (spacer) геля. Он полимеризуется под действием светочувствительного катализатора — рибофлавина, поэтому собранную установку помещают под ультрафиолетовой лампой мощностью 250—500 Вт. Фотополимеризация происходит и при обычном свете, но только за более длительное время. Начало образования геля фиксируют по переходу флюоресцирующего

электродным буфером, поэтому наслаивание заканчивают раствором электродного буфера, разбавленного в 10 раз. Полимеризацию геля-образца проводят при ультрафиолетовом освещении. Если тестируемый раствор содержит сахарозу, последнюю полимеризацию не проводят. Во время полимеризации геля-образца угольный электрод (см. рис. 96, е) закрепляют плексигласовым держателем (см. рис. 96, ж) в центре нижнего буферного сосуда (рис. 99, б). В последний наливают 1 л разбавленного в 10 раз раствора электродного буфера. После 15—20-минутной полимеризации геля-образца (завершение процесса определяют по образованию резкой границы раздела геля и слоя буферного раствора) стеклянные трубочки с гелем ввинчивают в концентрически расположенные отверстия (лунки) в дне буферного сосуда (рис. 99, а). Количество проб может быть меньше количества лунок. В таком случае в свободные отверстия верхнего буферного резервуара помещают пустые стеклянные трубочки таким образом, чтобы их концы были выше уровня буферного раствора. После закрепления стеклянных трубочек с гелем устанавливают электрод верхнего буферного сосуда. Верхний буферный сосуд присоединяют к нижнему (см. рис. 99, б). Воздушные пузырьки, нарушающие проводимость тока с концов трубочек, входящих в буферный раствор нижнего сосуда, удаляют многократным обмакиванием или встряхиванием. Заполняют верхний сосуд десятикратным разбавленным электродным буферным раствором, к которому добавляют 1 мл красителя. Электрофорез проводят при пониженной температуре. Время электрофореза определяется целями исследования и в первую очередь зависит от природы образца и концентрации геля. О положении белковых фракций и времени электрофореза судят по положению диска красителя, молекулы которого продвигаются вместе с подвижными белковыми ионами. В первые 0,5 ч электрофореза сила тока не должна превышать 2 мА на каждую отдельную трубочку (при меньшей силе тока тормозится продвижение мелких частиц образца в раствор верхнего буферного сосуда). После того как образец перейдет в распределительный гель, силу тока можно увеличить до 5 мА на каждую трубочку. После окончания электрофореза трубочки с гелем вынимают из сосуда. Гель извлекают из трубочек с помощью иглки под слоем деминерализованной воды, помещают в красящий раствор-фиксатор, после окрашивания промывают водой и помещают в раствор-дифференциатор. Многократной сменой раствора вымывают краситель, не связанный с белками. Часть геля, не содержащая белки, становится абсолютно прозрачной — электрофореграммы можно оценивать.

При документировании электрофореграмм рекомендуется делать снимки через слой растворителя. Электрофореграммы можно хранить в течение 1—2 мес в пробирках, наполненных раствором-дифференциатором. Для более длительного хранения можно высушивать гели на пластмассовом листе или стеклянной пластинке. Гели в течение нескольких дней усыхают. В высушенном состоянии гели могут храниться в течение нескольких лет. При помещении в раствор уксусной кислоты гель приобретает первоначальный объем.

Щелочную буферную систему используют в основном для анализа НК и белков кислого характера, а кислую — для анализа щелочных белков.

VI.2.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ [115, 135, 341, 359, 472]

Мицелий многократно промывают дистиллированной водой, растирают в ступке для получения гомогенной массы, отбирают 2—3 навески для определения белков и абсолютно сухого вещества мицелия. Навеску мицелия (3—4 г) помещают в ступку, многократно обрабатывают действием разной температурой (замораживание — оттаивание), растирают, операцию продолжают до разрушения всех клеток, затем помещают мицелий в холодильник на 20—24 ч и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 10—15 мин. Смывают раствор белка (альбумина), заливают новой порцией воды, центрифугируют, надосадочные жидкости объединяют (раствор № 1). Осадки в центрифужных пробирках заливают 25 мл 10%-ной NaOH, экстрагируют глобулины в течение 20—25 ч, центрифугируют, повторяя промывание 4—5 раз. Надосадочные жидкости объединяют, объем измеряют (раствор № 2). Осадки в центрифужных пробирках заливают 80%-ным этанолом для экстракции проламинов, оставляют на 24 ч. Центрифугируют, отмывают этанолом, надосадочные жидкости объединяют, измеряют объем (раствор № 3). Осадки заливают 0,2%-ным раствором NaOH для выделения глютелинов, оставляют на 10 ч, центрифугируют, надосадочные жидкости объединяют (раствор № 4). По 20 мл каждого раствора отбирают (в нескольких повторностях), помещают в колбы Кьельдаля емкостью 100 мл и определяют белок методом Починка [349]: добавляют в колбы по 0,4 г K_2SO_4 , 0,3 мл 10%-ного раствора Na_2MoO_4 , 0,5 мл 57%-ной $HClO_4$ и 3 мл концентрированной H_2SO_4 . Объем раствора доводят до 50 мл водой, взбалтывают; 20 мл раствора помещают в коническую колбу емкостью около 300 мл, добавляют одну каплю метилового оранжевого и титруют 2 н. раствором NaOH до окрашивания жидкости в желтый цвет. Затем приливают 100 мл раствора фосфатного буфера с pH 6,7, содержащего бромистый калий; раствор в колбе перемешивают и по стенке добавляют пипеткой 5 мл 0,12 н. хлорамина. Накрывают колбу часовым стеклом, перемешивают в ней жидкость круговым движением и оставляют на 25 мин. Затем добавляют 8 мл 20%-ного раствора йодистого калия, 10 мл 8%-ного раствора щавелевой кислоты и титруют выделившийся йод 0,02 н. раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала (индикатор), добавляемого в конце титрования.

Расчет содержания белка. 1 мл 0,02 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование, соответствует 0,09338 мг азота. Содержание белка в исследуемом веществе определяют по формуле

$$X = \frac{0,09338 \text{ ТВС} \cdot 100 (a - б) \cdot 100 \cdot 6,25}{\text{нвд} (100 - y)},$$

где X — количество белка (абсолютно сухое вещество; %); a — количество 0,02 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованное при контрольном титровании раствора всех реактивов без навески (мл); $б$ — то же в присутствии анализируемого вещества; C — объем раствора белковой фракции, полученного при объединении надосадочных жидкостей (мл); B — объем всего раствора, полученного после сжигания белка в колбе (мл); T — поправка к титру тиосульфата натрия; n — навеска мицелия (мг); v — объем всего раствора, взятого для анализа (мл); d — объем раствора белка, взятого для сжигания в колбе Кьельдаля (мл); 100 — для пересчета результатов анализа в проценты;

$100/(100 - y)$ — поправка на влажность; y — влажность анализируемого вещества (%); 6,25 — коэффициент для пересчета азота в белок [707, 794].

VI.2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

Метод основан на способности растворов белка (и некоторых аминокислот) давать цветные реакции с реактивом Фолина.

Растворы: 0,1 н. раствор NaOH; 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. растворе NaOH (реактив А).

0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе виннокислого натрия или калия (реактив В) : растворяют 10 г соли в 300 мл дистиллированной воды. В этот раствор вносят 5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и после ее растворения доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 л. Перед анализом смешивают 4,9 мл реактива А с 1 мл реактива В (реактив С).

Приготовление реактива Фолина. В круглодонную колбу емкостью 2 л помещают 100 г вольфрамовокислого и 25 г молибденовокислого натрия и растворяют их в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты (H_3PO_4) и 100 мл концентрированной HCl. К колбе присоединяют обратный холодильник, смесь кипятят на сетке в течение 10 ч. После кипячения в колбу вносят 150 г сернокислого лития (Li_2SO_4), добавляют 50 мл дистиллированной воды и 5 капель бромной воды. Смесь кипятят без холодильника 15 мин под тягой. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем дистиллированной водой до 1 л, фильтруют и хранят в темной склянке с притертой пробкой. Для определения кислотности полученного раствора его разводят в 10 раз и титруют 0,1 н. раствором NaOH по фенолфталеину.

Приготовление реактива Е. Готовят 1 н. реактив Фолина (например, если кислотность реактива Фолина равна 2,3, то для приготовления реактива Е необходимо взять 10 мл реактива Фолина и 13 мл воды). Реактив Е можно хранить длительное время.

Последовательность определения. Раствор белка готовят, как описано выше. К 2 мл исследуемого раствора белка (способ приготовления раствора — см. раздел VI.2.2.1.) добавляют 4 мл реактива С. Смесь перемешивают, через 10 мин добавляют 0,2 мл реактива Е, снова тщательно перемешивают и оставляют пробирку при комнатной температуре на 30 мин. Интенсивность синей окраски измеряют на спектрофотометре СФ-4 при длине волны 750 нм или на ФЭК-М с красным светофильтром.

Расчет содержания белка. Концентрацию белка в пробе определяют по оптической плотности раствора с помощью калибровочной кривой, которую строят на основании оптических характеристик ряда точно приготовленных белковых растворов нисходящей концентрации. В тех случаях, когда необходимо получить точное представление об абсолютном содержании белка, для построения калибровочной кривой используют кристаллические препараты чистого белка: яичного или бычьего альбумина.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО ФОНДА ГРИБОВ

VII.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Нуклеотидным фондом называют качественный состав и количественное содержание нуклеотидов, экстрагируемых тем или иным растворителем из биомассы. В качестве растворителя обычно используют хлорную кислоту (кислоторастворимые нуклеотиды); возможно применение и других экстрагентов (50%-ный этиловый спирт, 5%-ный раствор мочевины). Содержание рибонуклеотидов у грибов обычно составляет 2—6 мкмоль, или 0,6—2,0 мг/г сухой массы. Состав фонда достигает 15—20 и более соединений.

Нуклеотидный фонд выбранной стадии развития культуры дает определенную информацию о биохимических процессах, происходящих в клетке. Нуклеотиды — не только исходный материал для синтеза нуклеиновых кислот, они входят в состав многих важнейших коферментов и сами являются коферментами в синтезе и превращениях белков, углеводов, липидов [19].

В первые часы роста культуры синтезируются адениловые производные. АТФ участвует в процессах фосфорилирования всех прочих нуклеотидов, в реакциях, связанных с превращением энергии, переносом фосфатных групп. В лог-фазе развития грибов происходит интенсивный синтез полисахаридов, компонентов клеточной стенки. Коферментами в процессах синтеза хитина, фунгина и других полисахаридов являются уридилы производные — УТФ, УДФ-глюкоза, УДФ-N-ацетилглюкозамин. Цитидиловые нуклеотиды участвуют в липидном обмене.

В нуклеотидном фонде грибов обнаружены нетипичные нуклеотидсодержащие соединения, возможно, промежуточные метаболиты реакций синтеза — распада более сложных компонентов: в кислоторастворимой фракции мицелия *Fusarium* и *Claviceps* — гуанозинпропионовая кислота, в нуклеотидсодержащих соединениях адениловой и уридиловой природы у *Penicillium chrysogenum* — салициловая кислота.

Нуклеотидный фонд необходимо изучать: 1) в динамике развития культуры; 2) в выбранной фазе роста. Исследования динамики содержания нуклеотидов в клетке проводят без учета их функциональной активности, поскольку частичный или полный гидролиз нуклеотидсодержащих соединений приводит к анализу четырех компонентов, что упрощает и обедняет информацию.

В результате гидролиза общего нуклеотидного фонда 70%-ным раствором хлорной кислоты при 100° С в течение часа образуются аденин,

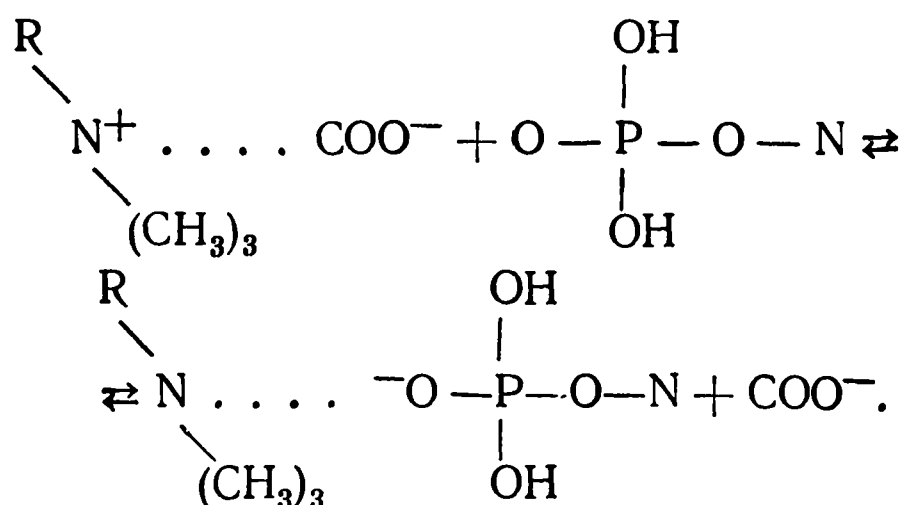
гуанин, цитозин, урацил. Эти основания легко анализируются методами бумажной или тонкослойной хроматографии. Более мягкий гидролиз (1 н. раствор соляной кислоты, 1 ч при 100° С) разрушает пуриновые производные до оснований, пиримидиновые — до мононуклеотидов. Два основания и два нуклеозидмонофосфата также разделяются методами хроматографии [224]. Смесь нуклеотидов постепенно гидролизуется до монофосфатов при хроматографии в очень кислых системах. В системах метанол — концентрированная соляная кислота — вода (7 : 2 : 1) и метанол — этанол — концентрированная соляная кислота — вода (50 : 25 : 6 : 19) весь нуклеотидный фонд распределяется на бумажной хроматограмме в следующей последовательности от старта: ГМФ, АМФ, ЦМФ, УМФ.

Полный анализ нуклеотидного фонда включает хроматографию на колонке с анионообменной смолой с последующим разделением гетерогенных фракций с помощью бумажной хроматографии и идентификацией гомогенных соединений физико-химическими методами. Для работы необходимы спектрофотометр, автоматический коллектор фракций, хроматографические камеры, хроматографическая бумага.

Нуклеотидкоферменты легко гидролизуются в кислых растворах. Например, скорость распада АТФ до АДФ в слабом растворе кислоты составляет около 0,35% в час. Поэтому выделение и фракционирование фонда рекомендуется вести на холоду. Замораживание мицелля до — 20° С и долгое хранение в таких условиях также приводят к качественному и количественному изменению фонда [20].

VII.2. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ [224]

Разделение нуклеотидов с помощью ионообменной хроматографии обычно осуществляют на колонках, заполненных сильноосновной анионообменной смолой «Дауэкс 1». Ионообменные смолы получают путем сополимеризации стирола — линейного полимера и дивинилбензола. Дивинилбензол образует поперечные связи (сшивки) между цепями полистирола. Обозначения «X 8», «X 10» указывают на процентное содержание дивинилбензола в смоле. В буферном растворе смола набухает и ее частицы образуют решетчатую структуру, которая обеспечивает проникновение нуклеотидов внутрь матрицы к заряженным группам на ионообменном участке. Ионный обмен происходит практически мгновенно, и является равновесным процессом.



Чем выше заряд обменивающейся молекулы, тем прочнее она связывается со смолой и тем труднее обменивается на другие ионы.

VII.2.1. ПОДГОТОВКА И РЕГЕНЕРАЦИЯ СМОЛЫ

Сухую смолу Дауэкс ($1 \times (8 - 10)$, 100—200 (200—400) меш) заливают дистиллированной водой, плохо оседающую «пыль» сливают, заливают новую порцию воды и перемешивают. Эту операцию повторяют несколько раз, после чего оставляют смолу для набухания на ночь. В набухший сорбент наливают смесь из равных объемов 2 н. раствора формиата натрия и 2 н. раствора муравьиной кислоты и оставляют на 3—4 ч при периодическом перемешивании. Затем смолу отмывают дистиллированной водой и вносят в колонку диаметром 0,9—1,0 см. Высота слоя смолы в колонке должна составлять 20 см. Через колонку пропускают 2—3 объема (от объема смолы) 75%-ного раствора муравьиной кислоты и окончательно отмывают до значений pH, характерных для воды. Колонка со смолой в формиатной форме готова к анализу.

Регенерацию смолы после опыта выполняют следующим образом: верхний темный слой удаляют, вносят недостающее количество сорбента, пропускают 2—3 объема муравьиной кислоты и промывают водой. Следят, чтобы над смолой всегда был слой воды.

VII.2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ ИЗ МИЦЕЛИЯ

Навеску сырого мицелия промывают холодной водой и кислото-растворимые соединения экстрагируют холодным 0,5 н. раствором хлорной кислоты в два приема по 200 мл в течение 60 и 30 мин. В отфильтрованный экстракт вносят активированный уголь из расчета 1,0 г на 10 г сырого мицелия. Хорошие результаты по сорбции нуклеотидов получают с импортными марками углей «Карборафин», «Норит», «Мерк» и отечественной маркой «А». Предварительно уголь кипятят с 1 н. раствором соляной кислоты в течение часа, затем отмывают водой, 1 н. раствором аммиака, метанолом и вновь водой.

Сорбцию на уголь ведут на холоду при периодическом перемешивании, проверяя остаточную оптическую плотность при 260 нм, до тех пор, пока количество УФ-поглощающего материала в фильтрате не превысит 10% исходного. Уголь тщательно отмывают водой на воронке Бюхнера и тут же элюируют УФ-поглощающие соединения 50%-ным водным раствором этилового спирта с 1,0% аммиака. Элюцию выполняют небольшими порциями на той же воронке Бюхнера. Элюаты объединяют и проверяют полноту десорбции с помощью спектрофотометра. Объединенные спиртовые фракции упаривают на роторном испарителе под вакуумом при 35—40° С до небольшого объема. Водный концентрат подщелачивают до pH 8,2 раствором гидроокиси бария и добавляют этиловый спирт до 75%-ной концентрации. Раствор ставят в холодильник. Хлопьевидный осадок бариевой соли нуклеотидов отделяют центрифугированием; надосадочная жидкость содержит нуклеозиды и основания. К осадку добавляют любой катионит в H^+ -форме (Дауэкс 50, КУ-2) в набухшем состоянии. Смесь перемешивают 5—10 мин стеклянной палочкой до исчезновения беловатой мути. Смолу отделяют центрифугированием, раствор нуклеотидов подщелачивают до pH 7—8. Концентрат можно хранить в замороженном состоянии в морозильной камере или анализировать сразу.

VII.2.3. КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КИСЛОТОРАСТВОРИМЫХ НУКЛЕОТИДОВ

При хроматографии смеси нуклеотидов используют градиентную элюцию. Система для колоночной хроматографии состоит из двух стаканов на 600 мл (резервуар) и 300 мл (смеситель), соединенных резиновыми или силиконовыми шлангами (рис. 100). Смеситель соединен шлангом с колонкой и снабжен магнитной мешалкой непрерывного действия.

Смесь нуклеотидов в водном растворе (рН 7—8) осторожно наносят на верхний слой смолы, и по мере сорбции стенки колонки про-

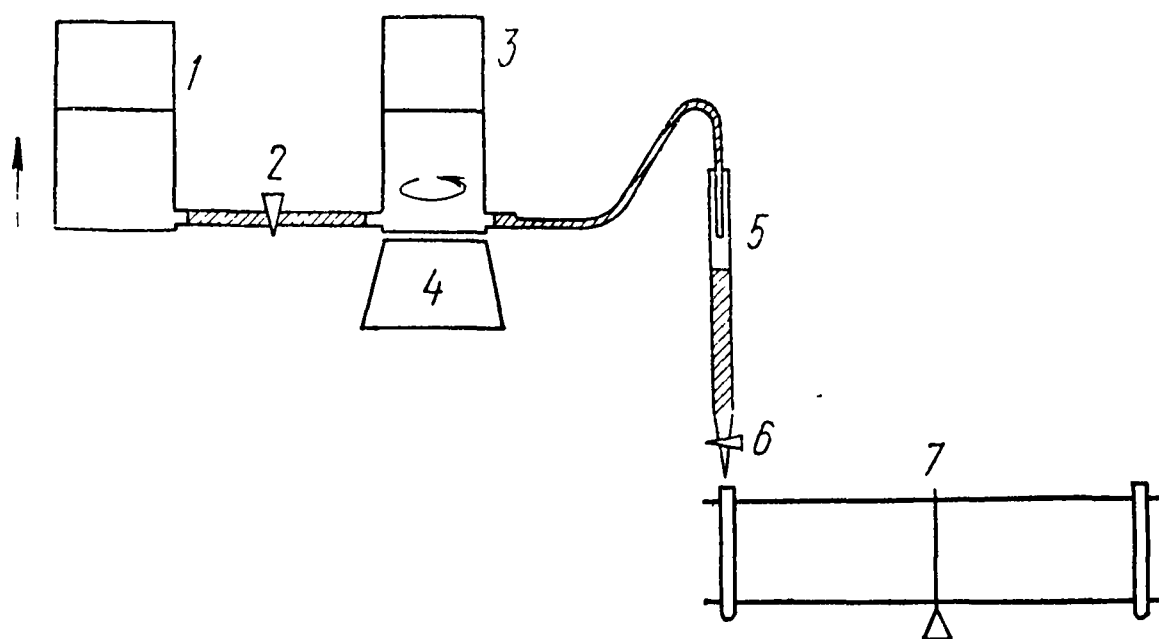


Рис. 100. Схема элюирующей системы для колоночной хроматографии нуклеотидов:

1 — резервуар; 2, 6 — кран (винтовой зажим); 3 — смеситель; 4 — магнитная мешалка; 5 — колонка со смолой; 7 — автоматический коллектор фракций.

мывают водой. Колонку промывают 2—3 объемами воды, закрывают кран выхода из колонки, наливают воду почти доверху колонки и соединяют ее с элюирующей системой. В смеситель наливают 250 мл дистиллированной воды, включают магнитную мешалку, и в резервуар заливают первую элюирующую систему. Резервуар поднимают до совмещения уровня жидкости в нем с уровнем в смесителе и открывают кран между этими сосудами. Постепенно открывают кран (винтовой зажим) при выходе из колонки и устанавливают скорость истечения раствора 0,8—1,0 мл/мин. Фракции объемом 5 мл собирают с помощью автоматического коллектора фракций.

Элюирующие системы:

- 1) 200 мл 0,6 н. раствора муравьиной кислоты;
- 2) 300 мл 1,0 н. раствора муравьиной кислоты;
- 3) 500 мл 3,0 н. раствора муравьиной кислоты;
- 4) 400 мл 4,0 н. раствора муравьиной кислоты, содержащей 0,2 М формиата аммония;
- 5) 600 мл 4,0 н. раствора муравьиной кислоты, содержащей 0,4 М формиата аммония;
- 6) 500 мл 4,0 н. раствора муравьиной кислоты, содержащей 0,8 М формиата аммония.

В каждой фракции определяют оптическую плотность при 260 нм против воды, значения экстинкции откладывают по оси ординат на миллиметровой бумаге, номера фракций — по абсциссе. Полученные

точки соединяют. Пример профиля элюции смеси нуклеотидов показан на рис. 101.

Фракции, составляющие отдельный пик, объединяют и упаривают на ротормном испарителе при 30—40° С, если пик элюировался му-

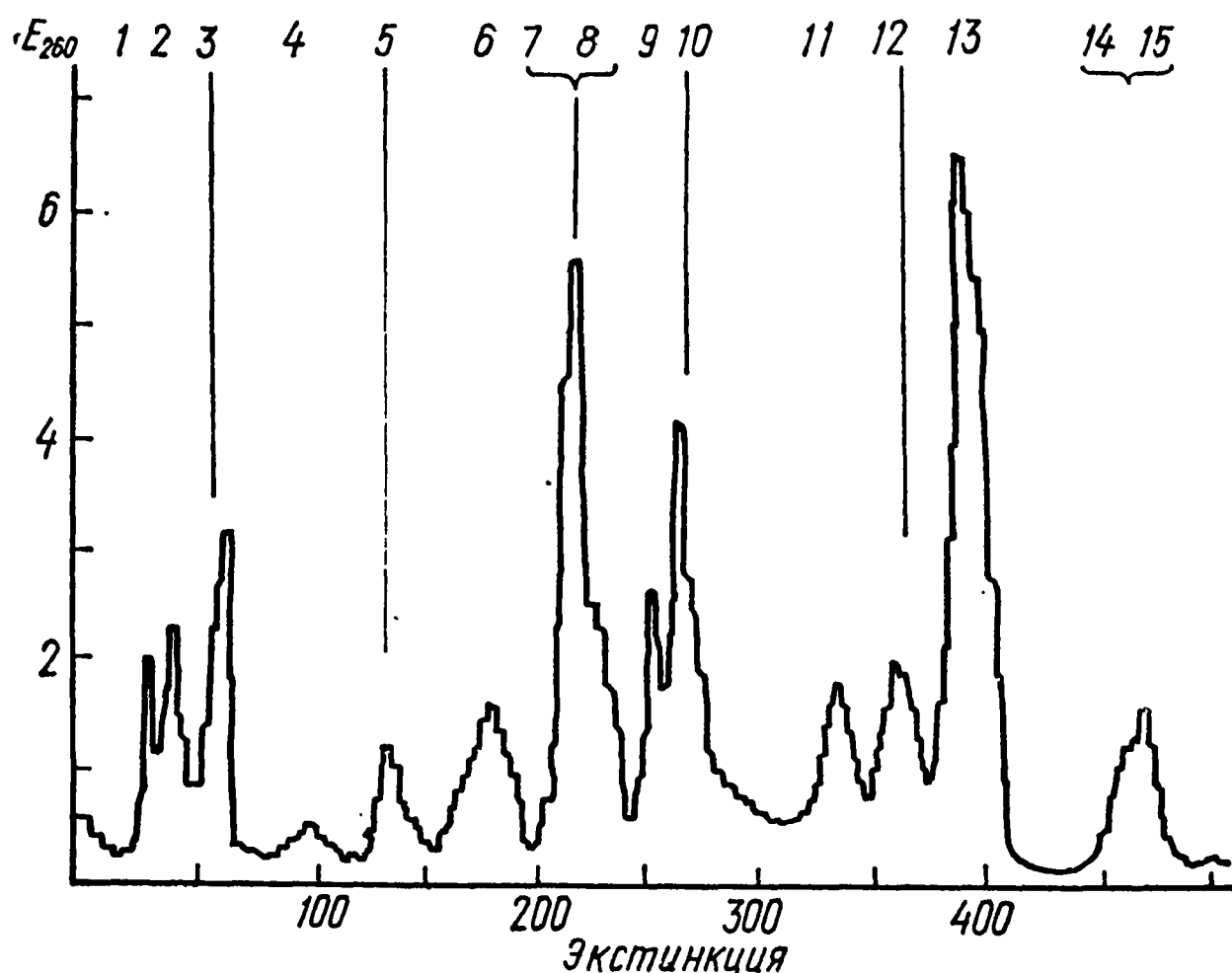


Рис. 101. Профиль элюции нуклеотидов с хроматографической колонки:

1 — ЦМФ; 2 — НАД; 3 — АМФ; 4 — сукциниладенозин; 5 — ГМФ; 6 — УМФ; 7, 8 — АДФ + ГДФ-манноза; 9 — УДФ-
N-ацетилглюкозамин; 10 — УДФ-глюкоза; 11 — ГДФ; 12 —
УДФ; 13 — АТФ; 14, 15 — ГТФ + УТФ.

равьиной кислотой. Фракции с формиатом аммония объединяют. УФ-поглощающие соединения сорбируют на уголь с последующей десорбцией щелочным раствором спирта. Спирт упаривают досуха и пробы хранят в морозильной камере холодильника.

VII.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ

Полученный профиль элюции дает первую информацию о компонентах нуклеотидного фонда. Как видно из рис. 101, смесь нуклеотидов фракционируется в определенной последовательности: монофосфаты цитидина, аденозина, гуанозина, уридина, далее ди- и трифосфаты в том же порядке. Нуклеотидный фонд всегда содержит большое количество производных моно-, ди- и трифосфатов, и в одном пике часто находится несколько соединений. Дальнейшее фракционирование и идентификация этих производных — кропотливая, но интересная задача.

VII.3.1. ХРОМАТОГРАФИЯ [224]

Метод основан на распределении соединения между двумя жидкими фазами. Хроматографическая бумага поглощает воду из атмосферы и задерживает ее целлюлозными волокнами. Эту воду можно рассмат-

ривать как один из растворителей — неподвижная фаза. Неводный растворитель (подвижная фаза) движется по бумаге под действием капиллярных сил и распределяет молекулы нанесенного на бумагу вещества между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе,

Т а б л и ц а 16. Аналитические характеристики некоторых УФ-поглощающих соединений, выделенных из мицелия *Penicillium sizovae* и *Aspergillus pallidus*

Соединение	λ_{max}		$E_{250/260}$	$E_{280/260}$	Rf АМФ		
	pH 2,0	pH 12,0			1	2	3
Аденозин	—	—	—	—	1,3	2,9	1,46
ЦМФ	278	272	0,53	1,9	—	—	0,85
НАД	260	—	0,85	0,26	0,47	0,90	0,86
АМФ	259	258	0,86	0,22	1,0	1,0	1,0
Сукциниладено- зин	267	269	0,80	0,43	1,3	—	—
ГМФ	256	258	1,00	0,65	0,78	0,80	0,60
УМФ	260	260	0,74	0,42	1,1	1,2	0,63
АДФ	259	257	0,82	0,23	0,78	0,68	0,74
ГДФ-манноза	—	—	1,12	0,60	—	1,1	—
УДФ-глюкоза	262	262	0,75	0,34	0,89	1,58	0,87
ЦДФ-N-ацетил- глюкозамин	262	262	0,76	0,33	0,81	1,83	0,40
ГДФ	256	258	0,97	0,70	0,60	0,36	0,35
УДФ	—	—	0,88	0,39	—	0,86	—
АТФ	259	258	0,85	0,30	0,60	0,30	0,47
ГТФ	—	—	—	—	—	—	0,20
УТФ	—	—	—	—	—	—	0,24

тем дальше оно продвигается по бумаге. Коэффициент распределения (Rf) для данного вещества определяется следующим отношением: $Rf = \text{расстояние, пройденное растворенным соединением} / \text{расстояние, пройденное фронтом растворителя}$.

В литературе часто приводят коэффициенты распределения нуклеотидов по отношению к одному из свидетелей — АМФ или УМФ, т. е. Rf АМФ и УМФ. Коэффициент распределения свидетеля принимают за 1,0.

Хроматографию нуклеотидов можно выполнять практически на всех типах хроматографической бумаги, но наиболее воспроизводимые результаты получаются на бумаге FN-11, FN-13 (ГДР) и Ватман.

Сухие остатки, полученные после хроматографии на колонке, растворяют в небольшом количестве (точный объем) воды и наносят на листы хроматографической бумаги в количестве 0,05—0,2 мл. Каждую пробу подвергают хроматографическому разделению в трех системах растворителей: 1) этиловый спирт — 1М аммонийацетатный буфер, pH 3,8 (75 : 30); 2) этиловый спирт — 1 М аммонийацетатный буфер, pH 7,5 (75 : 30); 3) изомасляная кислота — 1,0 н. раствор аммиака (10 : 6).

Применение трех систем для каждой пробы — обязательное условие определения гомогенности индивидуальных соединений. Параллельно с пробами наносят нуклеотиды — свидетели, ожидаемые в этом пике. Продолжительность нисходящей хроматографии составляет 12—16 ч. Разделение смеси нуклеотидов, входящих в пик, было достаточным при одноразовом прохождении растворителя.

Хроматограммы сушат на воздухе под тягой, и зоны веществ, поглощающих УФ, обнаруживают с помощью ультрахемискапа Брумберга. Зоны обрисовывают карандашом, определяют значения R_f (R_f АМФ) и сравнивают со свидетелями. Значения R_f АМФ некоторых нуклеотидов и их производных, наиболее часто наблюдаемых в фонде грибов, приведены в табл. 16. Значения R_f получены в условиях лаборатории и не являются абсолютными. На коэффициенты распределения могут оказывать влияние такие факторы, как температура, герметичность и насыщенность парами растворителя хроматографической камеры, содержание солей в пробе и др.

VII.3.2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ [91]

УФ-поглощающие зоны хроматограммы вырезают, измельчают и экстрагируют вещества 0,1 н. раствором соляной кислоты (5 мл) в течение ночи при комнатной температуре. В каждой пробе определяют длину волны при максимальном поглощении и поглощение (экстинкцию) при 250, 260, 270, 280, 290 нм. По отношениям поглощений 250/260, 270/260, 280/260 и 290/260 в кислой и щелочной (pH 12) средах адениловые, гуаниловые, цитидиловые и уридилиловые производные легко идентифицируются с помощью таблиц Венкстерна и Баева (см. табл. 16). В некоторых случаях необходимо бромирование оснований для установления принадлежности данного соединения к адениловым или уридиливым производным. Бромирование выполняется прямо в спектрофотометрических кюветах, методика описана в работе [91]. Бромирование уридиливых нуклеотидов приводит к исчезновению максимума при $\lambda = 260$ нм, адениловые производные не бромруются.

VII.3.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ

Концентрацию нуклеотидов в анализируемых пробах рассчитывают по формуле $A = E_{\lambda_{\max}} V / E \cdot 10^{-3}$, где A — концентрация нуклеотида (мкмоль); $E_{\lambda_{\max}}$ — экстинкция при максимальном поглощении; V — объем пробы (мл); $E \cdot 10^{-3}$ — молярный коэффициент экстинкции. Ниже приведены молярные коэффициенты экстинкции при pH 2,0:

Нуклеотиды	$\lambda_{\max}$, нм	$E \cdot 10^{-3}$
Адениловые	257	15,1
Гуаниловые	256	12,2
Уридилиловые	262	10,0
Цитидиловые	280	13,0

Концентрация нуклеотидов после хроматографии в кислых системах (см. выше) определяется по следующим формулам (мкмоль/5мл):

адениловых — $A = 0,363 \cdot \Delta 260$ ($\Delta 260 = E_{260} - E_{290}$); гуаниловых — $A = 0,47 \cdot \Delta 255$ ($\Delta 255 = E_{255} - E_{290}$); цитидиловых — $A = 0,73 \times \Delta 270$ ($\Delta 270 = E_{270} - E_{290}$); уридиловых — $A = 0,515 \cdot \Delta 260$ ($\Delta 260 = E_{260} - E_{290}$).

VII.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ФОСФАТНОЙ ГРУППЫ

Нуклеозидмонофосфаты, выделенные из грибов, наряду с фосфатной группой в 5'-положении содержат также нуклеозид-3'(2')-фосфаты. Местоположение фосфатной группы по отношению к рибозе определяют бумажной хроматографией, реакцией с орцином или с карбазолом.

VII.3.4.1. ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

В системе изопропиловый спирт — 1%-ный водный раствор сернокислого аммония (2 : 1) удастся разделить пуриновые мононуклеотиды в зависимости от локализации фосфорного остатка:

Нуклеотид	Rf	Нуклеотид	Rf
5'-ЦМФ	0,70	2'-ГМФ	0,49
5'-АМФ	0,30	3'-ГМФ	0,39
2'-АМФ	0,27	5'-УМФ	0,70
3'-АМФ	0,17		

VII.3.4.2. РЕАКЦИЯ С ОРЦИНОМ

Принцип реакции состоит в том, что пуриновые нуклеотиды реагируют с орцином с образованием окрашенного комплекса, но 5'-фосфаты вступают в реакцию значительно быстрее, чем 2'(3')-фосфаты.

К пробе объемом 3 мл, содержащей 10—30 мкг АМФ или ГМФ, добавляют 3 мл 0,1%-ного раствора хлорного железа в концентриро-

Т а б л и ц а 17. Зависимость времени реакции пуриновых нуклеотидов с орцином от положения фосфатной группы, определяемая по окрашиванию образующегося комплекса, %

Соединение	Время реакции, мин				
	7	15	25	35	45
3'-АМФ	26,5	62,0	86,5	97,0	100
5'-АМФ	66,0	92,0	99,2	100	<100
3'-ГМФ ³	26,9	60,8	87,0	97,4	100

ванной соляной кислоте и 0,3 мл спиртового раствора орцина (10 мг/мл в 95%-ном спирте). Смесь встряхивают и сразу колориметрируют при 660 нм, затем пробу нагревают на кипящей водяной бане в течение 8 мин, охлаждают и вновь измеряют экстинкцию. Операцию повторяют через 15, 25, 35 и 45 мин. Зависимость продолжительности реакции от положения фосфатной группы представлена в табл. 17.

VII.3.4.3. РЕАКЦИЯ С КАРБАЗОЛОМ

В ходе реакции 5'- и 3'-фосфаты образуют различно окрашенные продукты. К 1 мл пробы (0,1—1,0 мкмоль) добавляют при перемешивании 5 мл 75%-ного раствора серной кислоты и 1 мл свежеприготовленного раствора карбазола в абсолютном этиловом спирте (0,5 г в

Т а б л и ц а 18. Максимальная экстинкция окрашенных карбазолом производных 3'- и 5'-фосфатов

Положение фосфатной группы	Концентрация, мкмоль	E_{710}	E_{540}	E_{540}/E_{710}
5'-фосфат	0,5	0,345	0,176	0,510
3'-фосфат	0,5	0,049	0,415	8,4

100 мл). Смесь помещают на бурнокипящую баню на 2 мин, после чего охлаждают водой. В результате реакции 5'-фосфаты дают зеленовато-голубую окраску ($\lambda = 710$ нм), 3'-фосфаты — пурпурную (с максимумом при 540 нм) (табл. 18).

VII.3.5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НУКЛЕОТИДСАХАРОВ

Нуклеотиды, содержащие в своей молекуле углеводный фрагмент, подвергают мягкому кислотному гидролизу 0,01 н. раствором соляной кислоты в течение 10 мин на кипящей водяной бане. Пробу до и после гидролиза хроматографируют в системе растворителей 2 (см. VII.3.1)

Т а б л и ц а 19. Коэффициенты распределения обычно встречающихся сахарных компонентов нуклеотидов

Сахара	Rf (глюкоза)
Глюкоза	1,0
Галактоза	0,97
Манноза	1,18
Рибоза	2,12
N-Ацетилглюкоза	1,43
Глюкозамин	0,65

для определения полноты гидролиза и определяют качественное и количественное содержание нуклеотидного компонента в виде дифосфата. Углеводный фрагмент подвергают хроматографическому разделению в системе бутанол — уксусная кислота — вода (66 : 10 : 27) с возможными свидетелями. Хроматограмму проявляют 0,5%-ным раствором 2,3,5-трифенилтетразолий-хлорида (0,5%-ный раствор реактива смешивают с 10%-ным раствором едкого натра в 60%-ном метаноле в соотношении 1 : 3). Сахара проявляют в виде ярких вишнево-красных пятен на белом фоне.

Можно рекомендовать и другие реагенты: аммиачный раствор азотнокислого серебра, антрон, 2,4-динитрофенилгидразин с повторным опрыскиванием раствором феррицианида натрия и т. д. (табл. 19). Количественное определение N-ацетиламиносахаров выполняют после мягкого гидролиза УДФ-производных, как описано выше. Для проведения реакции необходимы тетраборат калия и *n*-диметиламинобензальдегид.

Приготовление реактивов. А. Тетраборат калия готовят смешиванием рассчитанных количеств борной кислоты и гидроокиси калия. Раствор концентрируют, кристаллы собирают, промывают холодной водой и сушат. Используют 0,8 М раствор, подщелоченный до рН 9,1 раствором едкого кали.

Б. 10,0 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты, содержащей 12,5% (по объему) 10 н. раствора соляной кислоты. Смесь хранят при 2° С. Перед использованием разбавляют 9 объемами ледяной уксусной кислоты. К гидролизованной пробе (0,5 мл) добавляют 0,1 мл реактива А, нагревают на водяной бане ровно 3 мин, охлаждают и вносят 3 мл раствора Б. Пробы тщательно перемешивают и помещают в баню на 20 мин при 36—38° С. После инкубации пробы охлаждают и измеряют оптическую плотность при 585 нм. Молярный коэффициент экстинкции *N*-ацетилглюкозамина составляет $18 \cdot 10^3$, *N*-ацетилгалактозамина — $7,4 \cdot 10^3$.

VII.4. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОГО ФОНДА [126]

Тонкослойная хроматография (ТСХ) в настоящее время является более совершенным методом анализа производных НК и нуклеотидакоферментов. ТСХ выгодно отличается от бумажной хроматографии значительно более высокой чувствительностью, большей скоростью и четкостью разделения. В настоящее время исследователя не удовлетворяет многодневное, даже многочасовое фракционирование смеси из неизвестных производных. ТСХ дает возможность провести анализ за несколько часов.

Количество сорбентов, используемых в ТСХ нуклеотидов очень велико, но наиболее широко применяемыми являются целлюлоза — ДЭАЭ и ПЭИ. ТСХ может быть использована как в аналитическом, так и в препаративном вариантах. В аналитическом варианте применяют слои сорбента толщиной 0,1—0,25 мм, позволяющие разделить 3—10 оптических единиц (при 260 нм). В слое толщиной 1—1,5 мм можно фракционировать до 100 оптических единиц. ТСХ имеет и свои сложности, особенно при элюции нуклеотидов со слоя. Приемы переноса вещества с сорбентом в пробирку для дальнейшей десорбции достаточно трудоемки и не сравнимы с простым вырезанием участков бумажной хроматограммы. В настоящее время этот вопрос в принципе решен благодаря тому, что слои наносят не на стекло, а на листы из тонкого пластика, с которым можно обращаться, как с бумагой.

VII.4.1. МИКРОТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Методы количественной оценки хроматограмм можно разделить на две категории. В первом случае разделенные вещества элюируют из слоя для дальнейшей оценки их количества. Во втором — разделенные вещества анализируют прямо в слое. Исследование вещества в слое может быть выполнено путем измерения площади и плотности пятна на проявленной хроматограмме или ее фотокопии. Эти величины связывают с количеством вещества в пятне, используя стандарты (свидетели) и калибровочные кривые. Количество вещества в пятне

определяют с помощью денситометра. Денситометрия включает сканирование пятна на хроматограмме пучком света. Прошедший или отраженный свет попадает на фотоумножитель. Разность интенсивности падающего и прошедшего (или отраженного) света измеряется в виде электрического сигнала и записывается на графике в виде пиков. Высота пика является мерой интенсивности пятна, ширина — пропорциональна длине пятна.

Микротонкослойную хроматографию оснований и нуклеозидов, выделенных из мицелия грибов, можно выполнять в слое, нанесенном на предметные стекла размером 26 × 76 мм [20].

VIII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕРМЕНТНЫХ ВИТАМИНОВ У ГРИБОВ

VIII.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Коферментные витамины, т. е. витамины, которые используются в клеточном обмене как структурные элементы для синтеза коферментов, представляют собой наиболее четко ограниченную группу витаминов. К ним относятся витамины группы В: никотиновая кислота, пиридоксин, биотин, тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, фолиевая кислота, липоевая кислота и кобаламин (витамин В₁₂) [465]. Микромицеты можно разделить по потребности в витаминах на ауксотрофные и гетеротрофные. *Ауксотрофные* синтезируют все витамины или некоторые. *Гетеротрофность* может быть выражена в потребности гриба в одном или нескольких витаминах.

Физиологический эффект витаминов определяется их превращением в коферменты и ферменты в микробной клетке. Коферментные витамины участвуют в ключевых реакциях окисления гексоз гексозомонофосфатного пути (ГМФ), распространенного у грибов, в анаэробном гликолитическом пути расщепления глюкозы, в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), в котором принимают участие все витамины группы В, а также в синтезе вторичных метаболитов. Для определения содержания витаминов применяют различные физико-химические и микробиологические методы [128, 206, 302]. В ряде случаев микробиологические методы оказались единственно возможными, превосходящими другие как по чувствительности, так и по специфичности.

Способность микромицетов к образованию кобаламина можно определить методом Л. С. Куцева [246], Н. Д. Иерусалимского и др. [181], а тиамина, биотина, пиридоксина, никотиновой и пантотеновой кислот — микробиологическим методом Одинцовой [335] и его модификациями [180, 209, 218, 231, 246, 303, 317, 365, 586]. Для определения некоторых витаминов приемлемы химические методы. Так, например, рибофлавин определяют флюорометрическим методом [360].

VIII.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА, БИОТИНА, ПИРИДОКСИНА, НИКОТИНОВОЙ И ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Микробиологический метод основан на применении ауксогетеротрофных микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов), утративших способность синтезировать тот или иной витамин или сразу несколько. Такие микроорганизмы являются индикаторными культурами.

VIII.2.1. ИНДИКАТОРНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Для определения витаминов используют дрожжевые индикаторные культуры, обладающие высокой чувствительностью, они реагируют на определенные витамины и малочувствительны к другим биологически активным веществам грибов.

1. *Debaryomyces disporus* — индикатор на пиридоксин, тиамин и его связанную форму — кокарбоксилазу. *Debaryomyces disporus* нуждается в пиридоксине, тиамине и частично инозите. Реагирует усилением роста при добавлении 0,000032 мкг пиридоксина, 0,0004 мкг тиамина на 1 мл питательной среды.

2. *Fabospora fragilis* — индикатор на никотиновую кислоту. Эта культура не синтезирует никотиновой кислоты, биотина и частично нуждается в пантотеновой кислоте и тиамине, реагирует на добавление 0,0005 мкг никотиновой кислоты на 1 мл питательной среды.

3. *Candida tropicalis* СК-4 — индикатор на биотин. Нуждается только в биотине и не требует внесения других витаминов в питательную среду [1].

4. *Saccharomyces ludwigi* — индикатор на пантотеновую кислоту [366].

Индикаторные культуры сохраняют на сусло-агаре при температуре 0—5° С и пересевают каждые 20 дней.

VIII.2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ

Для постановки опыта по микробиологическому определению биотина, тиамина, никотиновой кислоты, пиридоксина, пантотеновой кислоты используют среду Ридера следующего состава (г/л):

Сернокислый аммоний	3
Магний сернокислый	0,7
Натрий хлористый	0,5
Калий фосфорнокислый (однозамещенный)	1,0
Калий фосфорнокислый (двухзамещенный)	0,1
Глюкоза	20,0
Агар-агар	20,0

Растворы фосфатов и глюкозы готовят отдельно на дистиллированной воде, растворы других солей — на прокипяченной, отфильтрованной водопроводной воде. Стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

Растворы фосфатов и солей перед опытом смешивают, вносят стерильно глюкозу. Опыт проводят на среде Ридера с добавлением всех необходимых для применяемой индикаторной культуры витаминов, за исключением определяемого. Концентрация вносимых в среду витаминов составляет (мкг/мл): для определения тиамина — 1,0 инозита и 0,1 пиридоксина; для определения пиридоксина — 1,0 инозита и 0,1 тиамина; для определения никотиновой кислоты — 0,0001 биотина, 0,1 пантотеновой кислоты и 0,1 тиамина; для определения пантотеновой кислоты — 5,0 тиамина и пиридоксина, 0,002 биотина и 3,0 инозита. Среду засевают 2-суточной индикаторной культурой, выращенной на сусло-агаре при температуре 27° С, смывой физиологическим раствором и содержащей 20 000 клеток/мл (подсчет в камере Горяева). Для засева используют 0,05 мл микробной взвеси. Культуру можно

вносить из данного расчета в определенный объем среды. Для проведения качественного определения витаминов используют агаризованную среду Ридера.

VIII.2.3. КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определяют способность к образованию витаминов по наличию зон роста индикаторных культур вокруг дисков мицелия или цилиндров с культуральной жидкостью или экстрактом мицелия. Грибы выращивают в течение 10 сут при 28° С на агаризованной среде Чапека, в чашках Петри. С газона культуры гриба вырезают блок размером 10 × 10 мм и наносят на поверхность агаризованной среды Ридера с посеянной индикаторной культурой на определяемый витамин. По 150 мл среды Ридера разливают в кюветы из органического стекла размером 30 × 25 см. Выращивая грибы на жидких питательных средах (при поверхностном культивировании в течение 10—15 сут, при по-

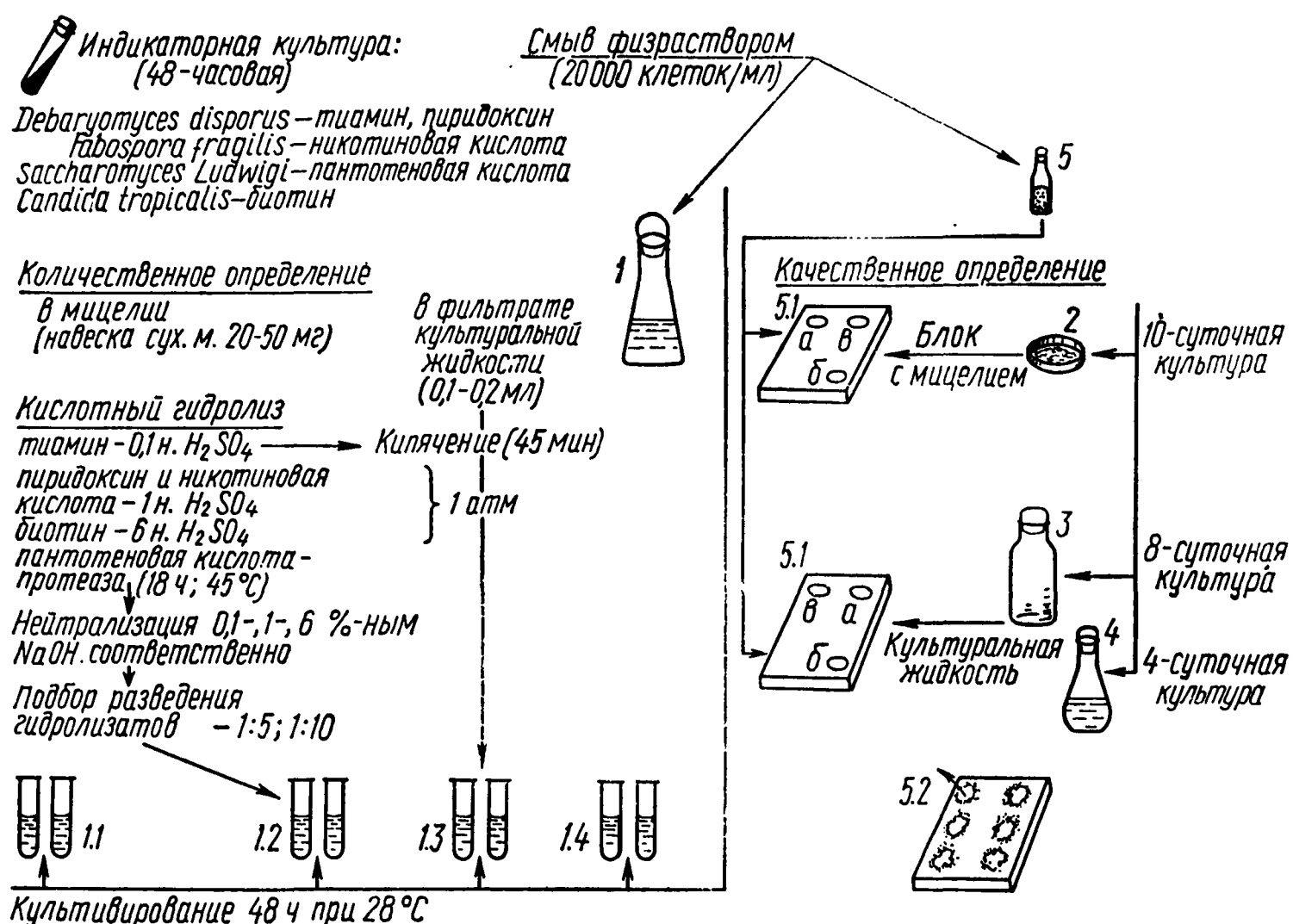


Рис. 102. Схема определения витаминов микробиологическим методом на примере исследования фузариев в процессе роста на жидкой питательной среде:

1 — среда Ридера (жидкая) с внесенной индикаторной культурой на определяемый витамин и необходимыми витаминами для роста данной индикаторной культуры; 1.1 — среда Ридера (контроль); 1.2 — среда Ридера с гидролизатом (0,1—0,2 мл); 1.3 — среда Ридера с культуральной жидкостью (0,1—0,2 мл); 1.4 — среда Ридера с различными концентрациями витамина (стандартные растворы); 2 — чашка Петри с культурой гриба, выросшей на агаризованной среде Чапека; 3 — матрасс с культурой гриба, выращенной методом поверхностного культивирования; 4 — колба с культурой гриба, выращенной методом погруженного культивирования; 5 — агаризованная среда Ридера, используемая при качественном определении витаминов группы В; 5.1 — кювета с разлитой агаризованной средой Ридера и нанесенным на ее поверхность блоком из мицелия (а), контролем витамина (б), фильтром, смоченным культуральной жидкостью (в); 5.2 — блоки с мицелием и зоны роста индикаторной культуры вокруг них.

груженном — 2—4 сут), на поверхность агаризованной среды Ридера наносят кружки фильтровальной бумаги, смоченной культуральной жидкостью гриба, или культуральную жидкость вводят в цилиндрики. Контролем служит определяемый витамин. Кюветы со средой выдерживают в термостате при температуре 28° С. По истечении 2 сут учитывают размеры зон роста индикаторной культуры вокруг мицелиального блока, фильтра, цилиндрика (рис. 102).

VIII.2.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Микробиологический метод определения витаминов дает возможность уловить ничтожно малые количества витамина (микрограммы) в среде. При определении витаминов по степени роста индикаторной культуры их количество выражают через массу клеток (в миллиграммах). Для этого грибы выращивают на синтетических питательных средах. В опыте для роста индикаторной культуры на определяемый витамин используют жидкую питательную среду Ридера. Содержа-

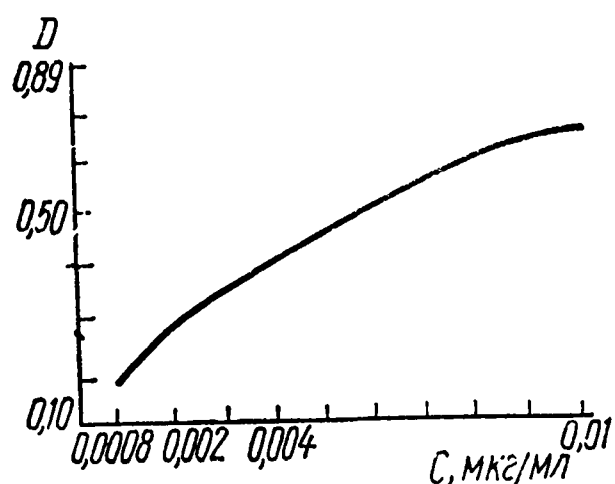


Рис. 103. Зависимость роста индикаторной культуры от концентрации тиамина в среде (D — оптическая плотность; C — концентрация тиамина, мкг/мл).

жание витаминов определяют в культуральной жидкости (0,1—0,2 мл) и гидролизатах мицелия (0,1—0,2 мл). Большая часть витаминов группы В находится в клетке гриба в связанной форме. Для перевода витамина в свободное состояние используют автолиз или кислотный гидролиз (предпочтительно) [303]. Навеску сухого мицелия (20—50 мг) тщательно растирают и помещают в градуированные пробирки емкостью 10 мл. Навеску и разведение экстракта из мицелия подбирают для исследуемого штамма гриба экспериментально в зависимости от содержания в мицелии того или иного витамина. Мицелий заливают определенным объемом серной кислоты в концентрациях, необходимых для экстракции витаминов (0,1 н. — для тиамина; 1,0 н. — для пиридоксина и никотиновой кислоты; 6 н. — для биотина), и подвергают гидролизу в автоклаве под давлением в 1 атм либо при определении тиамина кипятят на водяной бане в течение 45 мин. Для освобождения пантотеновой кислоты из ее связанных форм проводят гидролиз мицелия протеазой (выделенной, например, из *Aspergillus terricola* и приготовленной на фосфатном буфере (pH 7,0), в течение 18 ч при температуре 28° С [209]. Раствор фермента готовят из расчета 5 мг фермента на 1 мл фосфатного буфера. Для навески сухого мицелия в 25 мг используют 1 мл раствора фермента. Полученные из мицелия гидролизаты, кроме гидролизата для определения пантотеновой кислоты, нейтрализуют соответственно 0,1; 1,0; 6,0 н. NaOH до pH 7,0. Общий объем доводят дистиллированной водой до 5—10 мл в зависимости от концентрации витамина в гидролизате. Затем фильтруют и стерилизуют кипячением (20 мин) на водяной бане (см. рис. 102).

Длительность сохранения разных витаминов в гидролизатах и культуральной жидкости не одинакова. Наиболее лабильна пантотеновая кислота, которая в течение месяца разрушается более чем на

50%. Несколько медленнее снижается содержание тиамин, пиридоксина, никотиновой кислоты, которые сохраняются в течение нескольких недель без разрушения. Наиболее устойчив биотин, содержание которого в гидролизатах не изменяется в течение нескольких месяцев.

Среду Ридера с индикаторной культурой и витаминами разливают по 5 мл в пробирки и вносят 0,1—0,2 мл гидролизата мицелия или культуральной жидкости. Пробирки с пробой фиксируют в наклонном положении (для лучшей аэрации), инкубируют при 28° С в течение 48 ч. После инкубации в каждую пробирку добавляют по 2 капли концентрированной серной кислоты для приостановления роста дрожжевой культуры. Содержание выросших дрожжевых клеток в среде определяют по оптической плотности среды на ФЭК-56 (460 нм) с зеленым светофильтром. В качестве контроля используют среду Ридера с индикаторной культурой.

Одновременно испытывают влияние на рост индикаторной культуры различных концентраций определяемых витаминов и на основании полученных данных строят стандартную кривую, показывающую зависимость роста дрожжевых клеток, определяемого по оптической плотности, от содержания кристаллического витамина в среде (рис. 103). Основной раствор содержит 500 мкг/мл изучаемого витамина. Для его приготовления 5 мг витамина растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды, кипятят 10—15 мин и хранят в холодильнике в течение месяца.

Стандартные растворы содержат (мкг/мл): 0,002—1,0 тиамин; 0,0004—0,1 биотин; 0,02—25,0 никотиновой кислоты; 0,05—10,0 пантотеновой кислоты; 0,004—0,5 пиридоксина. Содержание витамина в образцах определяют с помощью стандартных кривых кристаллического витамина (см. рис. 103). Затем производят пересчет на 1 г абсолютно сухого мицелия или на 1 мл культуральной жидкости.

Пересчет на 1 г сухой массы мицелия:

$$\begin{array}{ccc} 0,00004 & - & a \\ 1 \text{ г} & - & x \end{array} \quad x = \frac{a \cdot 1}{0,00004},$$

где a — количество витамина в гидролизате, определенное по калибровочной кривой витамина; 0,00004 — постоянная величина, соответствующая количеству сухого мицелия (г) в 1 мл среды Ридера при навеске мицелия 20 мг и разведении гидролизата до 10 мл.

VIII.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_{12} МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Микробиологический метод позволяет качественно или количественно оценить содержание витамина B_{12} и различных его аналогов.

Микромицеты выращивают на среде Чапека с солями кобальта. Для качественного определения можно использовать и агаризованную среду Чапека. Качественное определение витамина B_{12} проводят аналогично описанным выше методам определения витаминов группы В с учетом условий роста индикаторной культуры (см. раздел VIII.2.3). При этом используют индикаторную культуру *Escherichia coli* 113-2, которая обладает чувствительностью 0,005—5,0 мкг/мл и отзывчива на все формы витамина. Штамм *E. coli* 113-2 выращивают на косяках агара (1% пептона; 4 — глюкозы; 0,5 — хлористого натрия; 3% агар-агара) при температуре 37° С в течение 24 ч. Хранят в холо-

дильнике и пересевают раз в месяц. Посевной материал для засева среды в опыте готовят за сутки на основной питательной среде с витамином B_{12} (0,00005 мкг/мл), ставят в термостат при 37°C на 20 ч. Затем бактериальную суспензию переносят в стерильные центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин (3000 g). Жидкость сливают, а осадок суспендируют в 2 мл физиологического раствора. Бактериальную взвесь в физиологическом растворе используют для засева среды из расчета 20 млн. клеток/мл среды.

Для определения витамина B_{12} используют основную питательную среду следующего состава (г/л):

Калий фосфорнокислый (двузамещенный)	7,0
Калий фосфорнокислый (однозамещенный)	3,0
Натрий лимоннокислый	1,0
Магний сернокислый	0,1
Аммоний сернокислый	2,0
Натрий хлористый	0,5
Натрий азотистокислый	0,0001
Глюкоза	20,0
Дистиллированная вода	1 л
pH 6,8—7,0	

Среду стерилизуют при давлении 1 атм. Глюкозу и фосфорные соли разделяют. При чашечном (качественном) определении и биоавтографии в среду добавляют 20,0 г агар-агара.

Агаризованную среду стерилизуют в колбах объемом 150 мл. В теплую среду (45°C) вносят культуру *E. coli* 113-3. Для лучшего проявления роста индикаторной культуры на каждые 150 мл среды вносят 4 мл 5%-ного раствора 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого, который способствует образованию красного пигмента при росте *E. coli* [586].

VIII.3.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Метод включает два этапа: построение стандартной кривой для чистого витамина и испытание исследуемого образца (гидролизата, культуральной жидкости, пробы на метионин). Поскольку в мицелии витамин частично находится в свободной форме, а основное его количество связано с белком, то предварительно гидролизуют мицелий цианистым натрием при pH 4—5. Гидролиз можно проводить также 5%-ным раствором NaNO_2 при pH 4—5. Навеску воздушно-сухого мицелия (150—300 мг) заливают 5 мл дистиллированной воды, подкисленной 1 н. раствором серной или соляной кислоты, через 10 мин добавляют 0,25 мл 5%-ного раствора NaNO_2 (pH 4—5). Смесь кипятят 30 мин, отфильтровывают и в зависимости от предполагаемого количества витамина разводят гидролизаты 2%-ным раствором лимоннокислого натрия до 5—10 мл и используют для определения. Поскольку в гидролизатах мицелия и культуральной жидкости может содержаться метионин, к которому чувствителен штамм *E. coli* 113-3, проводят контрольный анализ, разрушая витамин щелочным гидролизом. Для этого 2 мл гидролизата или культуральной жидкости смешивают с 2 мл 0,2 н. NaOH и кипятят в течение 20 мин на водяной бане в колбе с обратным холодильником. После охлаждения раствор нейтрализуют 1 н. раствором HCl и разбавляют дистиллированной водой, как и в опыте с неразрушенным витамином.

Для построения калибровочной кривой используют растворы витамина, содержащие 0,1—0,00005 мкг/мл витамина, приготовленные в стерильных условиях из стандартного раствора, содержащего 2 мкг/мл витамина, хранящегося в холодильнике. К среде с индикаторной культурой добавляют разные количества исследуемого раствора (гидролизата, культуральной жидкости и контрольной пробы с разрушенным витамином B_{12}), а в другие — по 0,1 мл раствора витамина разной концентрации. Каждую пробу исследуют в трех повторностях. К опытному образцу добавляют 0,1; 0,4; 0,6 мл гидролизата или культуральной жидкости, инкубируют при температуре 37° С и через 24 ч определяют интенсивность роста нефелометрически. Содержание витамина в образцах определяют с помощью калибровочной кривой витамина B_{12} . Затем проводят пересчет на 1 г сухой массы мицелия или на 1 мл культуральной жидкости. Если наблюдается рост *E. coli* в контрольных пробирках, где витамин разрушен, то находят по калибровочной кривой соответствующие росту значения, которые вычисляют по количеству витамина в пробах, в которых витамин не разрушен [246].

VIII.3.2. БИОАВТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Биоавтографический метод используют для исследования образцов, которые содержат значительное количество аналогов витамина B_{12} . Этот метод позволяет установить присутствие неактивных форм витамина. При биоавтографическом определении сначала проводят хроматографический анализ пробы, затем полоску хроматограммы помещают в среду, засеянную культурой. Гидролизат или культуральную жидкость, используемые для количественного определения общего содержания кобаламина микробиологическим методом, изучают также методом хроматографии для определения истинного витамина B_{12} (цианкобаламина). Для хроматографического анализа используют полоски бумаги шириной 0,5 см и растворитель следующего состава: 100 мл бутанола; 1 мл концентрированного аммиака; 2,5 мл 1%-ного раствора цианистого калия; 50 мл дистиллированной воды. Хроматография длится 20—40 ч при температуре 37° С. Метчик витамина (0,1 мкг/мл — не менее 0,001 мкг/мл) наносят в количестве 0,005—0,01 мл. Высушенную полоску хроматограммы помещают на поверхность агаризованной среды, засеянной индикаторной культурой. Инкубируют в термостате при 37° С в течение 18 ч. Зоны роста имеют удлиненную форму. Расчет производят по таблицам, предложенным Н. Д. Иерусалимским [180]. По метчику витамина определяют содержание истинного витамина B_{12} в пробе.

VIII.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА

Для определения рибофлавина применяют флуорометрический метод [360, 425], поскольку растворы рибофлавина в воде и некоторых других растворителях при освещении УФ-светом дают яркую желто-зеленую флуоресценцию, интенсивность которой пропорциональна концентрации рибофлавина. Максимум флуоресценции рибофлавина — 535 нм.

VIII.4.1. ОСВОБОЖДЕНИЕ СВЯЗАННЫХ ФОРМ РИБОФЛАВИНА ИЗ МИЦЕЛИЯ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Связанные с белком моно- и динуклеотиды рибофлавина не обладают флюоресценцией. Для образования свободных флюоресцирующих форм рибофлавина необходимо разрушить эту связь. Разрыв связи моноклеотидов с белком обычно достигается кислотным гидролизом, а для расщепления динуклеотидов применяют фосфатазные препараты. У грибов, растений и других организмов обнаружена форма рибофлавина, прочно связанного с белком не через фосфорную кислоту, а посредством пептидных связей, для разрушения которых требуется протеолиз, осуществляемый протеолитическими препаратами (трипсином, панкреатином). При определении связанных форм рибофлавина у грибов проводят обработку образцов трипсином с последующим гидролизом ТХУ.

К навеске сухого мицелия (20—30 мг) прибавляют 2 мл фосфатного буфера (рН 7,8—8,0), выдерживают в кипящей бане 45 мин, затем охлаждают до 30° С, добавляют трипсин (1 мг) и помещают в термостат при 37° С на 17 ч. Затем приливают 2 мл 20%-ного раствора ТХУ и кипятят 10 мин. В остывшие пробы добавляют $\frac{1}{4}$ объема 4 М раствора K_2HPO_4 (1 мл), при этом рН смеси должно составлять 5,5—6,0, доводят объем до 10 мл и отфильтровывают. Фильтрат (5 мл) окисляют перманганатом калия, для чего прибавляют 4%-ный раствор $KMnO_4$ до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 5 мин. Спустя 5 мин прибавляют по каплям 3%-ный раствор перекиси водорода до исчезновения окраски и доводят объем до 10 мл дистиллированной водой. В случае выпадения осадка раствор фильтруют и затем флюорометрируют.

VIII.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

К 4 мл культуральной жидкости гриба прибавляют 1 мл K_2HPO_4 (рН смеси 6,0), несколько капель 4%-ного раствора $KMnO_4$, спустя 5 мин несколько капель перекиси водорода, доводят объем раствора до 10 мл, фильтруют и флюорометрируют, гасят флюоресценцию небольшим количеством соды ($NaHCO_3$) и гидросульфита натрия ($Na_2S_2O_4$) и снова флюорометрируют. По разнице между первым и вторым определением находят истинную флюоресценцию рибофлавина. Контроль—раствор рибофлавина. Для приготовления основного раствора рибофлавина (40 мкг/мл) 10 мг витамина растворяют в 250 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике. Раствор сохраняет стойкость в течение месяца. Непосредственно перед определением готовят рабочий стандартный раствор, содержащий 0,4 мкг рибофлавина в 1 мл.

Расчет содержания рибофлавина производят по формуле $(A-B) \times \times 0,4 \nu / VP$ (мкг/г вещества), где A —показания флюорометра для испытуемого раствора; B — показания флюорометра для испытуемого раствора после гашения; V — показания флюорометра для стандартного раствора; P — навеска мицелия (г); ν — общее разведение пробы (мл).

IX. ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГРИБОВ

IX.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности любой живой нормальной клетки (микробного, растительного, животного происхождения), обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов: вирусам, бактериям, актиномицетам, грибам, водорослям, простейшим или к злокачественным опухолям, задерживая их рост или полностью подавляя их развитие. К антибиотикам относят также соединения, получающиеся при смешанном (биологическом и химическом) синтезе, когда к основной структуре вещества, полученного в процессе биосинтеза, путем химического синтеза присоединяют определенную группировку. Таким способом получены некоторые формы пенициллинов и других активных препаратов.

Микроскопические грибы характеризуются способностью продуцировать антибиотики разной химической природы. Известно более 150 антибиотиков грибного происхождения, в том числе из пенициллинов — более 40, базидиомицетов — 26, грибов других родов — 45.

С общебиологической точки зрения биосинтез антибиотиков у грибов принципиально не отличается от образования других продуктов обмена — органических кислот, спиртов, аминокислот. Все эти соединения в отличие от образования белков, углеводов, липидов, витаминов условно относят к вторичным метаболитам.

По химической природе антибиотики из грибов можно разделить на четыре группы: 1) производные уксусной кислоты (гризеофульвин, спинулозин, микофеноловая, стипитатовая, пуберуловая кислоты); 2) производные сахаров (небуларин, устилаговая кислота); 3) производные аминокислот (пенициллин, ликомаразмин, лилацин, глиотоксин, мицелианамид, аспергилловая кислота); 4) комбинированные формы антибиотиков, представляющие комплекс веществ, образующихся двумя или тремя упомянутыми выше путями (микофеноловая кислота).

С точки зрения практического применения антибиотиков грибного происхождения их условно объединяют в три группы: 1) препараты, широко используемые в медицинской практике (пенициллин и его производные, цефалоспорины, гризеофульвин, микроцид); 2) антибиотики, применяемые в сельскохозяйственных целях (трихотецин, боверин, фумагиллин, глиотоксин, виридин, патулин и др.); 3) обширная группа антибиотических веществ, насчитывающая десятки препаратов, еще не нашедших применения, к которым относятся прежде всего новые недостаточно изученные антибиотики.

Получение препаратов антибиотиков — сложный и многоступенчатый процесс. Он складывается из комплекса последовательных исследований, которые можно свести в основном к следующим этапам: 1) изыскание грибов-антагонистов в природе и выделение их в чистую культуру; 2) изучение спектра действия и определение антибиотической активности выделенных культур антагонистов; 3) подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков; 4) первичная идентификация антибиотика на ранних этапах изучения; 5) выделение и химическая очистка активно действующего начала из культуральной жидкости и мицелия, а также сравнение полученного антибиотика по биологическим и химическим показателям с уже известными препаратами для выявления новых свойств полученных антибиотических веществ; 6) изучение механизма действия и испытание токсических и лечебных качеств антибиотиков на животных (препараты медицинского назначения); 7) испытание фитотоксических и других свойств (препараты немедицинского назначения); 8) разработка технологии получения антибиотика в лаборатории и внедрение ее в промышленное производство.

IX.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ-АНТАГОНИСТОВ ИЗ ПОЧВЫ

Естественным местообитанием микроскопических грибов является почва. Наиболее распространенными почвенными микромицетами являются пенициллии, аспергиллы, фузарии, мукоровые, триходерма для отдельных типов почв и географических зон [47]. К почвенным грибам относятся также микоризные, съедобные, многие виды фитопатогенных грибов (головневые, ржавчинные, мучнисторосяе, склеротиния и др.), которые часто не учитывают при исследованиях из-за отсутствия универсальных методов выявления и недостаточного селективного анализа. Грибы-антагонисты выделяют из почвы общепринятыми методами, наиболее приемлемые из которых изложены ниже [146, 147].

IX.2.1. ПОСЕВ ПОЧВЕННОЙ СУСПЕНЗИИ НА ЭЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ

Для выделения грибов из природных субстратов пользуются агаризованной минеральной средой Чапека или агаризованным пивным сусликом с pH 5,8—6,2 (7° по Баллингу). Время инкубации чашек 24—48 ч при температуре 26—28° С. Выросшие колонии грибов пересевают в пробирки с соответствующей средой и они служат исходным материалом для дальнейших исследований.

IX.2.2. МЕТОД СКУЧЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ НА АГАРОВОЙ ПЛАСТИНКЕ

Почвенную суспензию в разведениях 1 : 100, 1 : 1000 высевают на питательную среду, где образуются скученные колонии микроорганизмов. При этом создаются условия для проявления антагонистических свойств почвенной микрофлоры. Антагонистов обнаруживают по стерильным зонам вокруг колоний грибов.

IX.2.3. ПРЯМАЯ ИНОКУЛЯЦИЯ КОМОЧКАМИ ПОЧВЫ

Этот метод часто применяют в модификации: комочки почвы высевают на питательный агар, предварительно засеянный тест-культурой. Через 24—48 ч инкубации при температуре 26—28° С комочки почвы обрастают колониями грибов, вокруг которых образуются зоны задержки роста тест-организма.

IX.2.4. ОБОГАЩЕНИЕ ПОЧВЫ

Почву, из которой предполагают выделить антагонист, обогащают микроорганизмами тех видов, по отношению к которым хотят получить антагонист. Через определенные сроки (бактерии — через сутки, грибы — через 3—5 сут) почву высевают в виде отдельных комочков на агаровые пластинки в чашках Петри, предварительно засеянные тем же микроорганизмом, который был использован для обогащения почвы.

IX.3. ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГРИБОВ-АНТАГОНИСТОВ

После выделения гриба-антагониста в чистую культуру определяют его видовую принадлежность и приступают к изучению антибиотических свойств по отношению к различным тест-микробам: сапрофитным и патогенным формам, грамположительным, грамотрицательным, спорообразующим микроорганизмам, гифальным, дрожжевым грибам, вирусам.

IX.3.1. ВЫБОР ТЕСТ-МИКРООРГАНИЗМОВ

Чем шире набор тест-объектов, тем перспективнее выявление антагонистов с нужными свойствами. Тест-организмы играют большую роль при дальнейшей работе с антагонистом и при выделении антибиотика. Поэтому выбирается тест-микроб, наиболее чувствительный к данному антибиотику. При установлении антимикробных спектров необходимо помнить о том, что различные штаммы одного вида тест-микроорганизма проявляют различную чувствительность к одному и тому же антибиотическому препарату. Поэтому культуры, используемые в качестве тестов, следует обозначать точным названием вида и штамма. Это требование необходимо строго соблюдать, особенно в тех случаях, когда антимикробный спектр приводится как одна из характеристик вновь описываемых антибиотиков.

В настоящее время разработаны биологические методы качественного и количественного определения антибиотических свойств грибов на стадии культуральной жидкости и физико-химические методы учета антибиотической активности препаратов антибиотиков [66, 119, 136, 146, 457, 474, 480].

IX.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПЛОТНЫХ СРЕДАХ

При поиске продуцентов антибиотиков выделенные культуры антагонистов чаще всего испытывают на плотных питательных средах.

IX.3.2.1. МЕТОД АГАРОВЫХ БЛОКОВ

Гриб-антагонист высевают на агаризованную среду Чапека или сусло в чашку Петри. После того как антагонист хорошо вырастет, пробочным сверлом (диаметр 8 мм) вырезают агаровые блоки из колоний гриба и переносят их на поверхность другой агаровой пластинки, предварительно засеянной одним из тест-микроорганизмов. Чашки с агаровыми блоками помещают в термостат на 20—24 ч при температуре, оптимальной для развития тест-культуры. Если выделяемый грибом антибиотик подавляет рост тест-микроба, то вокруг агарового блока образуется зона отсутствия роста.

В центр чашки Петри помещают по одному блоку, вырезанному из колонии гриба-антагониста, затем в чашку наливают питательный агар, пригодный для развития тест-микробов, с таким расчетом, чтобы уровень агара был на 1—2 мм ниже уровня блока. Затем по радиусам агаровой пластинки высевают штрихами тест-организмы и чашки помещают на 20—24 ч в термостат. Отсутствие роста штриха тест-культуры на определенном расстоянии от блока указывает на угнетение ее антибиотиком, образуемым изучаемым грибом-антагонистом.

IX.3.2.2. МЕТОД ДВОЙНЫХ ПЛАСТИНОК

Чашку Петри делят стеклянной перегородкой пополам. В одну половину вносят питательный агар с антагонистом, другую заливают стерильным агаром. После этого на поверхность агара штрихами наносят тест-организмы. Метод штриха дает возможность определить антибиотическую активность гриба-антагониста по отношению к нескольким тест-организмам. Если антагонист (гриб) или тест-культура (бактерия) требуют различных сред и температурного режима для своего развития, необходимо пользоваться методом двойных агаровых пластинок.

IX.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКИХ СРЕДАХ

Грибы-антагонисты культивируют при температуре 26—28° С поверхностным (10—15 дней) или погруженным (3—4 дня) методом.

При определении антибиотических свойств грибов, выращиваемых на

жидких питательных средах, необходимо иметь в виду, что некоторые антибиотики (гризеофульвин, мицелианамид и др.) накапливаются в мицелии продуцента и практически не выделяются в питательную среду. Поэтому для оценки антибиотической активности гриба следует изучать антибиотические свойства как культуральной жидкости, так и экстрактов из мицелия.

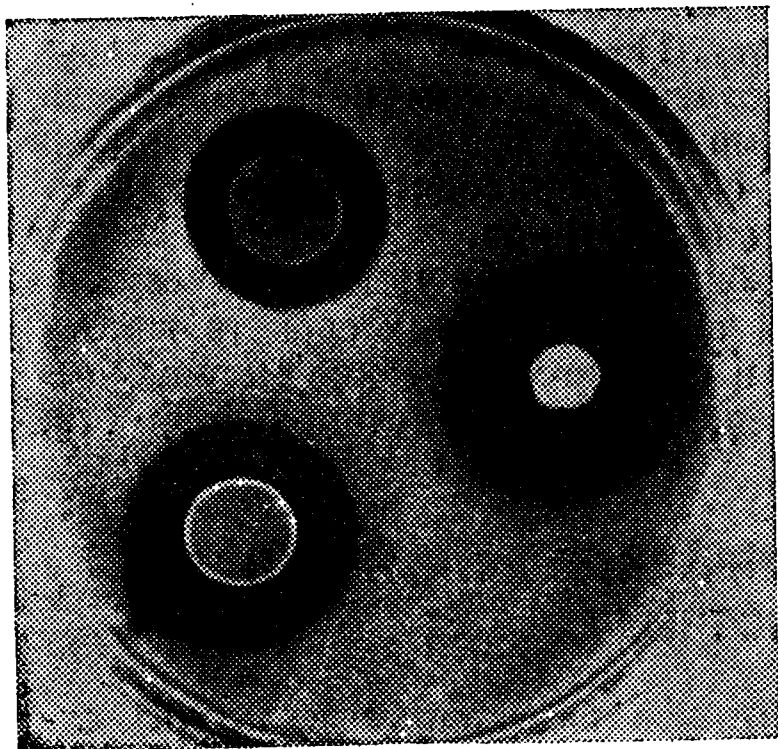


Рис. 104. Изучение антибиотической активности культуральных жидкостей грибов методом бумажных дисков.

IX.3.3.1. МЕТОД БУМАЖНЫХ ДИСКОВ

Диски из фильтровальной бумаги, смоченные в испытуемых культуральных жидкостях или экстрактах из мицелия гриба, накладывают на поверхность питательного агара, засеянного тест-организмом. Чашки помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста тест-микроба, на 24 ч (если тест-организм — бактерии) или на 48—72 ч (если тест-организм — грибы или дрожжи). При наличии в испытуемом растворе антибиотика вокруг бумажного диска образуется зона задержки роста тест-микроба (рис. 104).

IX.3.3.2. МЕТОД ЖЕЛОБКА

В питательном агаре, разлитом в чашки Петри, вырезают желобок, который заполняют культуральной жидкостью продуцента-антибиотика вместе с расплавленным агаром. Перпендикулярно желобку наносят штрихи тест-микробов.

IX.3.3.3. МЕТОД ВИСЯЧЕЙ КАПЛИ

В модификации [455] метод используется для изучения фунгистатических и фунгицидных свойств микромицетов на стадии культуральных жидкостей по отношению к фитопатогенным грибам (головневым и мучнисторосным).

1. Хламидоспоры и оидии фитопатогенных грибов проращивают в капле культуральной жидкости грибов-антагонистов (разведения 1 : 10; 1 : 100; 1 : 1000), нанесенных на внутреннюю поверхность перевернутых чашек Петри, на крышки которых (служащие дном) наливают стериль-

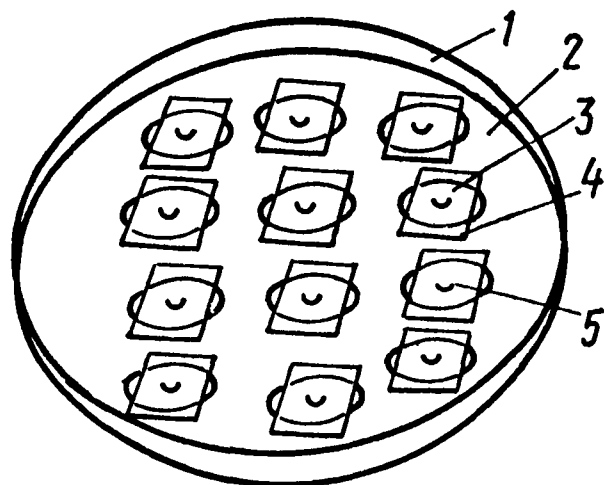
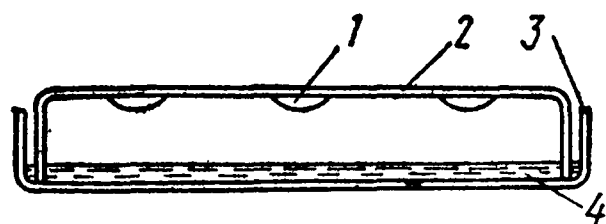


Рис. 105. Изучение фунгистатических свойств антибиотиков методом проращивания тест-грибов в висячих каплях, нанесенных на внутреннюю поверхность крышек чашки Петри:

1 — висячие капли антибиотиков (в разведении); 2 — крышка чашки Петри; 3 — дно чашки Петри; 4 — стерильная вода для создания влажной камеры.

Рис. 106. Проращивание тестмикробов в висячих каплях:

1 — чашка Петри; 2 — фильтровальная бумага; 3 — луночки; 4 — покровные стекла; 5 — висячие капли антибиотиков (в разведении).

ную водопроводную воду для создания влажной камеры (рис. 105).

2. Хламидоспоры и оидии фитопатогенных грибов проращивают в висячих каплях культуральных жидкостей микромицетов, которые наносят на покровные стекла. Затем стекла размещают над лунками в фильтровальной бумаге, которая в восемь слоев выстилает дно чашки Петри (рис. 106).

Пользуясь этими методами, можно, не нарушая стерильности опыта, наблюдать под микроскопом ингибицию прорастания спор фитопатогенных грибов в исследуемых препаратах антибиотиков [456].

Учет опыта производят по количеству проросших хламидоспор или оидий (в процентах) в шести полях зрения микроскопа после 24-часовой инкубации их в каплях культуральных жидкостей и стерильной водопроводной воды (контроль) при температуре 26—28° С.

IX.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Для количественного определения содержания антибиотиков в культуральных жидкостях, экстрактах, растворах на всех стадиях изучения антибиотиков применяют биологические, химические, физико-химические и другие методы. Биологические методы количественного определения антибиотиков основаны на избирательном действии антибиотика на клетки культуры тест-организма [119, 146, 147, 455].

IX.4.1. МЕТОД СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

IX.4.1.1. НА ЖИДКОЙ СРЕДЕ

Культуральную жидкость или раствор антибиотиков разводят стерильной дистиллированной водой в 2, 4, 8, 16, 32, 68 и т. д. раз; 1 мл жидкости каждого разведения смешивают с 1 мл питательного бульона и засевают одной или двумя каплями тест-организма (нагрузка тест-культуры — 200 000 микробных тел в 1 мл питательной среды). Антибиотическое действие испытуемых растворов антибиотиков определяют по степени развития тест-культур после 18—24-часовой инкубации их при оптимальной температуре. Бактериостатическое действие учитывают визуально, бактерицидное — посевами через 24 ч на плотные среды.

IX.4.1.2. НА ПЛОТНОЙ СРЕДЕ

Метод аналогичен методу серийных разведений на жидкой среде с той лишь разницей, что 1 мл культуральной жидкости определенного разведения или раствора препарата антибиотика смешивают с 1 мл расплавленного питательного агара, перемешивают и оставляют в наклонном положении до затвердения агара. Затем наносят узкой полоской тест-организм и через сутки инкубации в термостате определяют титр антибиотика в испытуемом образце. Определение антибиотической активности методом серийных разведений на плотных питательных средах можно проводить в пробирках и чашках Петри. Преимущество чашечного метода по сравнению с пробирочным состоит в том, что в первом случае каждое разведение изучаемого препарата может быть испытано одновременно по отношению к нескольким тест-микробам.

Методом серийных разведений определяют количество антибиотика не только в условных единицах разведения, но и в весовых или стандартных единицах того или иного антибиотика.

IX.4.2. МЕТОД ДИФФУЗИИ В АГАР

Диффузионные методы количественного определения антибиотиков основаны на способности антибиотических веществ диффундировать в агаризованных средах и образовывать зоны, в которых не развиваются тест-микроорганизмы.

IX.4.2.1. МЕТОД ЦИЛИНДРОВ

На поверхность питательного агара в чашках Петри расставляют металлические цилиндры (с внешним диаметром 8 мм, внутренним — 6 мм и высотой 10 мм) из алюминия или нержавеющей стали. Используют двухслойный питательный агар, второй слой которого содержит суспензию тест-организма в определенной концентрации. В одни цилиндры вносят испытуемый раствор антибиотика, в другие — стандартный раствор того же антибиотика. После 24-часовой инкубации при температуре, оптимальной для развития тест-культуры, измеряют диаметры зоны задержки роста тест-микроба. Расчет количества антибиотика в 1 мл раствора ведут или по стандартной кривой, полученной на полулогарифмической сетке, или по таблицам Дмитриевой [146, 147].

IX.4.2.2. МЕТОД ЛУНОК

В толще агаровой пластинки делают лунки диаметром 8 мм. В одни лунки вносят раствор испытуемого антибиотика, а в другие — стандартный раствор препарата и поступают так же, как и в методе цилиндров. Замена цилиндров лунками дает преимущества при испытании трудно диффундируемых антибиотиков.

Помимо методов, приведенных выше, известны экспресс-метод определения антибиотической активности [119, 146, 147], различные химические и физические методы определения активности пенициллинов, цефалоспоринов, гризеофульвина и других антибиотиков [136, 474].

IX.5. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

Распознавание антибиотиков из грибов так же, как и антибиотиков, образуемых другими микроорганизмами, на ранних этапах исследования проводят несколькими способами: 1) ранней идентификацией антибиотика по его продуценту и спектру антимикробного действия; 2) методом бумажной хроматографии; 3) по устойчивым к определенным антибиотикам формам тест-организмов; 4) характерным химическим реакциям и другим свойствам.

IX.5.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПО ПРОДУЦЕНТУ И СПЕКТРУ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

Морфологические, культуральные, физиологические свойства, являющиеся видовыми признаками гриба-антагониста, и спектр его антимикробного действия по отношению к ряду тест-организмов позволяют высказать первые предположения о том, продуцентом какого антибиотика является изучаемая культура гриба. Естественно, что ранняя идентификация антибиотика грибного происхождения по его продуценту имеет предположительный характер. Известно немало случаев, когда один и тот же антибиотик продуцировался разными видами грибов. Так, способность к биосинтезу пенициллина выявлена у 26 видов рода *Penicillium*, 9 видов рода *Aspergillus*, у возбудителя трихофитии — *Trichophyton* и у термофильного гриба *Malbranchea pulchella*. Синнематин (цефалоспорин), выделенный из культуральной

жидкости *Cephalosporium*, идентичен пенициллину. Глиотоксин, например, продуцируется триходермой, пенициллиями, аспергиллами; пеницилловая, микофеноловая, пуберуловая, пуберулоновая кислоты, цитринин, патулин — пенициллиями и аспергиллами. Поэтому при идентификации антибиотиков из грибов кроме видового определения продуцента необходимо прибегать к более точным методам распознавания антибиотических веществ, основанным на сочетании биологических и химических исследований [47, 119, 136, 146, 457, 474].

IX.5.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ СБОРНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

Для первичной характеристики исследуемых антибиотиков на ранних этапах изучения (культуральная жидкость, экстракты из мицелия, агаровые блоки), частичной идентификации, установления однородности и выяснения путей дальнейшего препаративного выделения их используют метод сборной хроматографии на бумаге, предложенный Ишида и дополненный рядом авторов [66, 474].

На полосы хроматографической бумаги (ЛБ) шириной 1 см и длиной 20 см на расстоянии 3 см от нижнего конца наносят микропипеткой 0,01 мл культуральной жидкости, раствор антибиотика или блок, содержащий продиффундировавший в толщу питательного агара антибиотик. Полосы хроматографической бумаги с нанесенным на них антибиотиком помещают в хроматографические камеры диаметром 5 см, высотой 40 см. На дно камер наливают растворители (40 мл).

Восходящая хроматография. Набор систем растворителей может быть различным и составлен по разным принципам. Для идентификации грибных антибиотиков используют набор систем, предложенных чешскими исследователями [66]: 1) дистиллированная вода; 2) 80%-ный ацетон; 3) *n*-бутанол, насыщенный водой; 4) этилацетат, насыщенный водой; 5) бензол, насыщенный водой; 6) ацетон — бензол — вода (30 : 9 : 1); 7) изопропанол — хлороформ — бензол — вода (30 : 4 : 4 : 2); 8) *n*-бутанол — гексан — ацетон — вода (20 : 9 : 10 : 10); 9) метанол — изоамилацетат — вода (25 : 14 : 1).

Растворители наливают в камеры заранее для насыщения их объема. После прохождения растворителем отмеченного расстояния (20 см) хроматограммы извлекают из камер, высушивают на воздухе и проявляют биоавтографически на агаризованных средах, засеянных чувствительной к изучаемому антибиотику культурой тест-микроорганизма. Антибиотические вещества проявляются на однородном микробном газоне в кюветах в виде зон угнетения роста тест-микроба после его 24-часовой инкубации при оптимальной температуре (рис. 107). Измеряют расстояние от точки нанесения антибиотика до середины стерильной зоны, образующейся вокруг участков хроматограммы, и вычисляют значение R_f антибиотика [66]. На основании значений R_f строят кривые зависимости растворимости данного антибиотического вещества от применяемых систем растворителей. На оси абсцисс откладывают обозначения растворителей, на оси ординат — значения R_f . Полученные кривые сравнивают с кривыми известных антибиотиков, составленными по тем же растворителям, для установления сходства с известными препаратами. Эти данные используют также с целью выбора наилучшего растворителя для последующей экстракции антибиотика из культуральной жидкости или мицелия гриба.

Многие физиологически активные вещества — токсины, фарма-

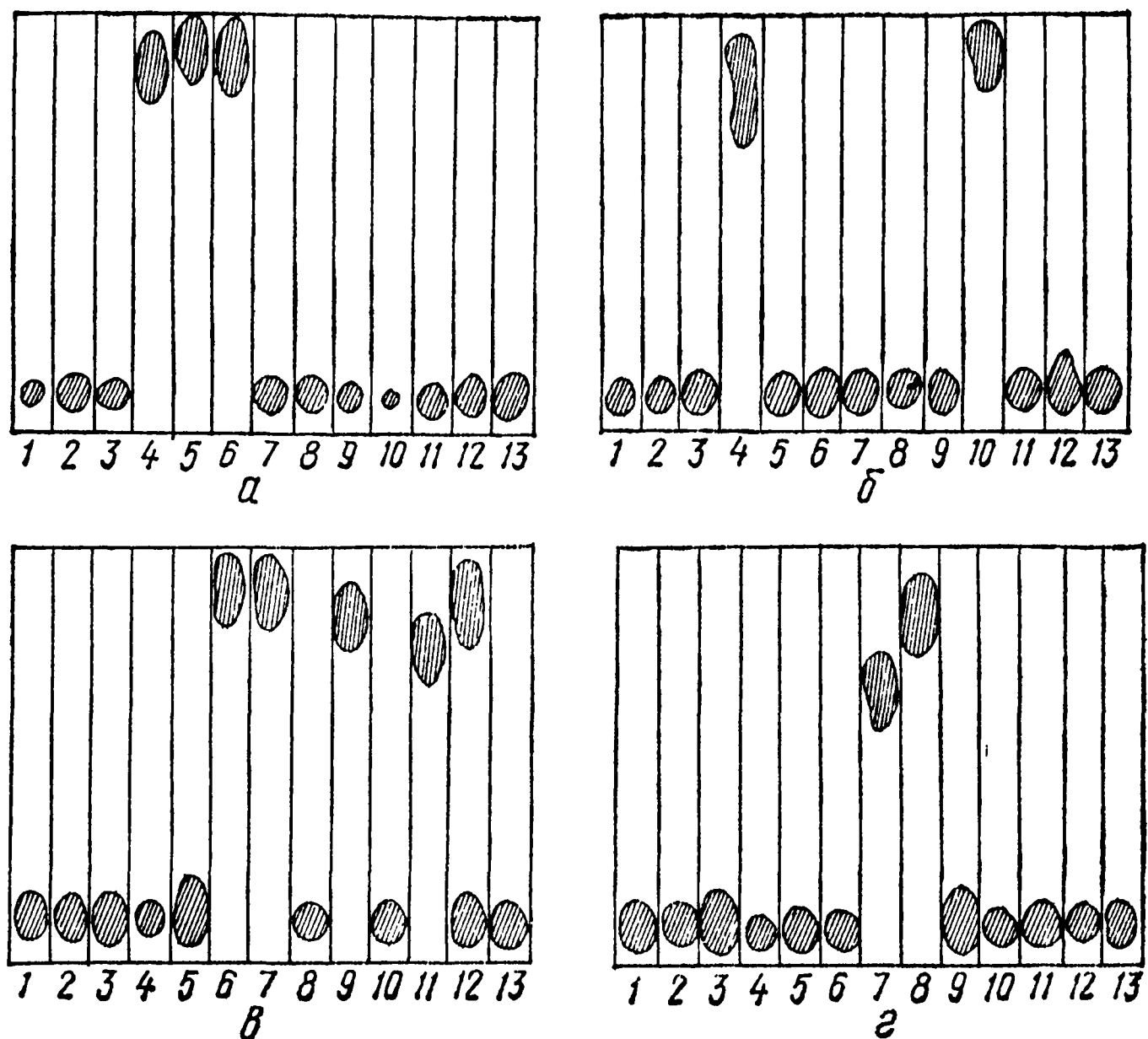


Рис. 107. Сборные хроматограммы культуральных жидкостей:
 а — *Penicillium implicatum*; б — *P. kursanovi* штамм 9585; в — *P. bilai* штамм 134; г — *P. multicolor* штамм 4946 (хроматограммы проявлялись на золотистом стафилококке, штамм 209); 1—13 — системы растворителей по Шевчику:
 1 — дистиллированная вода; 2 — 3%-ный раствор хлористого аммония; 3 — метанол; 4 — ацетон; 5 — этилацетат; 6 — бутанол, насыщенный водой; 7 — серный эфир; 8 — хлороформ; 9 — петролейный эфир; 10 — бензол; 11 — этанол; 12 — 0,1%-ный раствор HCl; 13 — бутанол — ледяная уксусная кислота — вода.

кологические препараты, стимуляторы и ингибиторы роста растений — также оказывают антибиотическое действие. В некоторых случаях химические и физические способы обнаружения таких препаратов не разработаны, поэтому при их хроматографии также применяют биоавтографические методы [474]. Некоторые антибиотики из грибов, например патулин, фузариевая кислота, обладают фитотоксическими свойствами. Их идентифицируют по подавлению роста растений.

IX.5.2.1. МЕТОД рН-БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Антибиотик хроматографируют в системах растворителей на бумаге, обработанной буферными растворами (рН 2—10). При этом все антибиотики в зависимости от особенностей хроматографического поведения можно разделить на несколько групп. Для антибиотиков кислот (пенициллинов, гладиоловой кислоты, цефалоспорина Р, цитринина, геодина, терреевой кислоты) характерно уменьшение подвижности при увеличении рН. Антибиотики оснований, наоборот, увеличивают подвижность при повышении рН. В случае нейтральных антибиотиков (фреквентина, глиотоксина, патулина, трихотецина,

виридина) значение R_f не зависит от pH буфера. Наибольшее значение R_f для амфотерных антибиотиков наблюдалось при pH 7,0—8,0.

IX.5.2.2. МЕТОД КРУГОВОЙ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Д. Доскочилова и М. Вондрачек [136] разработали систему идентификации новых антибиотиков на стадии культуральных жидкостей. По внешнему диаметру чашки Петри вырезают круг хроматографической бумаги. На расстоянии 1 см от центра круга по радиусу наносят раствор антибиотика или помещают агаровые блоки. В центре круга делают отверстие, в которое вставляют фитиль. Длина фитиля равна высоте чашки, на дно которой наливают соответствующий растворитель. В этот растворитель и погружают нижний конец фитиля. Круг фильтровальной бумаги помещают на чашку и прижимают сверху крышкой. Антибиотические вещества разгоняют в течение 1—3 ч. Высушенный от растворителя круг хроматографической бумаги разрезают на сегменты в соответствии с количеством исследуемых образцов антибиотиков и накладывают на засеянные тест-микробом чашки. Следует отметить, что каким-либо одним из приведенных методов нельзя идентифицировать антибиотик. Только сочетание разнообразных методов хроматографии с электрофорезом на бумаге, адсорбционным и спектральным анализом в области ИК и других лучей может привести к положительному результату.

IX.5.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПО УСТОЙЧИВЫМ ФОРМАМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метод основан на способности микроорганизмов вырабатывать устойчивость к одним антибиотикам, сохраняя чувствительность к антибиотикам другой химической природы. Этим методом можно установить, имеет ли изучаемый антибиотик сходство с каким-либо из известных препаратов. Для идентификации антибиотиков следует использовать устойчивые формы микроорганизмов и соблюдать определенные условия: 1) учитывать, насколько специфична устойчивость микробов к антибиотику, под воздействием которого они получены; 2) помнить, что в некоторых случаях перекрестная устойчивость связана со сходством механизма действия антибиотиков на бактерии, а не с идентичностью сравниваемых антибиотиков; 3) нельзя использовать для целей идентификации антибиотиков формы тест-микроорганизмов, которые обладают неспецифической или малоспецифической устойчивостью.

Изучение действия вновь выделенных антибиотиков на устойчивые и чувствительные формы микробов может помочь не только при отборе новых антибиотиков, но и при контроле промежуточных продуктов в процессе химической очистки антибиотиков [146, 147].

IX.5.4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПО КАЧЕСТВЕННЫМ ХИМИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ

Характерные химические реакции, используемые для ранней идентификации антибиотиков (на стадии культуральных жидкостей или полуочищенных концентратов), образуемых пенициллиями и аспергиллами, приведены в приложении 6.

IX.6. ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Антибиотики, образуемые грибами, могут накапливаться как в культуральной жидкости (пенициллины), так и в мицелии (гризеофульвин) продуцента. Приемы, с помощью которых извлекают активное начало, сводят к четырем основным методам: 1) экстракции, 2) адсорбции, 3) элюции, 4) осаждению.

При извлечении антибиотиков из культуральной жидкости проверяют их устойчивость к этой жидкости при разных значениях рН (3; 7; 10), при комнатной температуре и нагревании до 60° С в течение 10 мин (для выяснения белковой природы). Затем экстрагируют культуральную жидкость различными органическими растворителями, подобранными методом сборной хроматографии: хлороформом, бутанолом, этилацетатом, эфиром и другими при различных значениях рН. Если антибиотик переходит хотя бы в один из растворителей, он в значительной степени освобождается от балластных веществ. Если антибиотик не экстрагируется органическими растворителями при разных значениях рН, испытывают его адсорбцию на угле с последующей десорбцией водными растворами ацетона или адсорбцию на ионообменных смолах. В некоторых случаях антибиотики выделяют путем осаждения из культуральной жидкости, изменяя рН и добавляя соответствующие катионы или анионы.

Антибиотики из мицелия грибов извлекают экстрагированием органическими растворителями. Широкое распространение получил метод экстракции измельченного мицелия (после отделения его от культуральной жидкости) 60%-ным спиртом-ректификатом в соотношении 1 : 5 (на 1 кг мицелия 5 л спирта). Мицелий грибов заливают 60%-ным спиртом на сутки при температуре 37° С, затем спиртовой экстракт отфильтровывают, мицелий отжимают. Фильтрат упаривают на водяной бане до 1/20 части первоначального объема. В каждом отдельном случае получения антибиотических веществ из мицелия грибов условия выделения выбирают экспериментально [455, 456]. Полученные полуочищенные концентраты подвергают дальнейшей очистке и разделению методом противоточной хроматографии (бумажной и тонкослойной) [66, 79].

Антибиотическую активность всех получаемых продуктов и фракций определяют на всех этапах химической очистки антибиотиков микробиологическими методами.

IX.7. ОТБОР ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Вирусы, являясь внутриклеточными паразитами, размножаются только внутри живых клеток. Это обстоятельство определяет специфику оценки противовирусных антибиотиков [146, 147, 480].

IX.7.1. МОДЕЛИ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Для отбора противовирусных препаратов широко применяют модель вируса гриппа при лабораторной вирусной инфекции. Белых мышей заражают через нос суспензией легочной ткани мышей, содержащей 1—1000 инфекционных доз вируса гриппа. Исследуемые культураль-

ные жидкости вводят подкожно 2 раза в день в максимальной дозе. Продолжительность лечения, способы и пути заражения могут варьировать в зависимости от конкретных условий опыта. С помощью этого метода выделен противовирусный антибиотик геленин из *Penicillium funiculosum* [119].

IX.7.2. КУЛЬТУРА ТКАНИ

Для культивирования вирусов используют ткани животных и человека. Метод применяется для отбора антибиотиков, подавляющих вирусы с некротическим действием. Пропитанные антибиотиком диски фильтровальной бумаги раскладывают на поверхность агаризованной среды с культурой ткани. Если изучаемый антибиотик задерживает рост вируса, вокруг диска видна зона роста неповрежденных вирусом клеток ткани. С помощью этого метода были изучены противовирусные свойства антибиотика М-8450 из *Penicillium stoloniferum* [480].

IX.7.3. МОДЕЛИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ

В качестве модели наиболее часто используют вирус табачной мозаики (ВТМ) в разных модификациях.

Контактный тест. Антибиотик смешивают в равных объемах с суспензией вируса. Смесь выдерживают 3 ч при 20° С. Затем ее втирают в листья табака или дурмана. Учитывают число некротических пятен, вызванных вирусом в контрольных и подопытных листьях.

Метод Шорина [480]. Из агаровой культуры гриба-антагониста вырезают блоки и приклеивают их желатином к поверхности листа дурмана, зараженного вирусом. Листья помещают во влажную камеру и через несколько дней учитывают число некротических пятен. Если блок содержит антибиотик, подавляющий развитие вируса, то вокруг блока ткань растения оказывается здоровой.

Метод Рыжкова. Изолированные листья табака заражают ВТМ и погружают половину листа в растворы, содержащие различные антибиотики. Контрольные листья погружают в воду. Через 3—4 дня противовирусную активность выражают соотношением числа некрозов на обеих частях листа.

Методы Шлигина, Роулинса, Егорова. Из листьев табака, зараженного ВТМ, вырезают диски, которые помещают на поверхность раствора испытуемых антибиотиков. Через определенное время определяют содержание вируса в дисках.

IX.7.4. МОДЕЛИ ФАГОВ

Фаги обладают некоторыми признаками и свойствами, общими для вирусов растений и животных, поэтому их можно использовать для первичного отбора антибиотиков с антивирусным действием.

Контактный метод. Метод позволяет отобрать антибиотики с фагоцидным действием. Суспензию фага смешивают с изучаемым препаратом, выдерживают 12 ч при 37° С и в различных разведениях добавляют к агару, содержащему бактериальные клетки. Через 48 ч подсчитывают число живых частиц фага.

Метод диффузии в агаре. Если антибиотик обладает антифаговым действием, вокруг диска, смоченного испытуемым раствором антибиотика, образуется зона хорошо выросшего тест-микроорганизма без

пятен лизиса фагом. Этим методом был отобран фумагиллин из *Aspergillus fumigatus* [119].

Отбор антибиотиков с фагостатическим действием. Суспензию бактериальных клеток выдерживают 1 ч в термостате, прибавляют бактериофаг и встряхивают 10 мин для адсорбции частиц фага на клетках бактерий. Затем смесь разводят в соотношении 1 : 50 000 питательным бульоном, содержащим исследуемый препарат и помещают в термостат; через 1; 3; 5 ч высевают на агаризованные среды и определяют число частиц фага в опыте и контроле [480].

IX.8. ОТБОР ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ

В качестве тест-объекта используют раковые клетки (культуры тканей, асцитные клетки), а также мутанты микроорганизмов с пониженным дыханием. Во всех случаях окончательную оценку антиопухолевого действия препарата осуществляют в опытах на животных [146, 147].

IX.8.1. ЧАШЕЧНЫЙ МЕТОД

Асцитные клетки Эрлиха тщательно смешивают с теплой агаровой средой (пептон, глюкоза, плазма крови) и разливают в чашки Петри. На застывшую пластинку, содержащую асцитные клетки рака, накладывают агаровые блоки или диски фильтровальной бумаги, смоченные культуральной жидкостью или очищенным препаратом антибиотика. После инкубации чашек в течение нескольких часов при температуре 37° С освобождают поверхность агаровых пластинок от агаровых блоков или бумажных дисков и заливают ее 0,05%-ным раствором метиленового синего. Чашки снова помещают в термостат на несколько часов. Если изучаемые препараты убивают асцитные клетки рака, то на месте агаровых блоков или дисков фильтровальной бумаги образуются голубые зоны. Свойство обесцвечивать метиленовый синий, т. е. превращать его в лейкосоединение, связано с выделением живыми асцитными клетками дегидраз. Убитые клетки не выделяют дегидраз, а поэтому метиленовый синий не обесцвечивается.

Пробирочный метод используется как модификация чашечного.

IX.8.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБОВ С ПОНИЖЕННЫМ ДЫХАНИЕМ

Тест — мутант стафилококка УФ-3, бактерии кишечной группы, дрожжевые организмы с пониженным коэффициентом дыхания. Определение противораковой активности антибиотиков основано на тех же принципах, что и определение антибиотической активности антибактериальных препаратов.

IX.8.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Взвесь асцитных клеток Эрлиха смешивают с таким же объемом изучаемого препарата и полученную смесь помещают в рефрижератор при 4° С на 4 ч, после чего ее вводят мышам подкожно. Для контроля используют физиологический раствор. Через 10 дней мышей убивают

и определяют наличие опухолей и их размеры. Если изучаемый препарат убивает асцитные раковые клетки, то они не вызывают образования опухолей.

IX.9. БИОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

Механизм действия многих антибиотиков на молекулярном уровне уже известен. По типу воздействия на определенный биохимический процесс антибиотики условно разделены на пять групп:

- 1) ингибиторы энергетического обмена;
- 2) ингибиторы функционирования бактериальных мембран;
- 3) ингибиторы синтеза белка;
- 4) ингибиторы обмена НК;
- 5) ингибиторы синтеза пептидогликана.

Доказано, что в каждой из этих групп разные антибиотики могут действовать на микробную клетку по-разному. Однако установленный набор ингибиторов позволяет изучать участки связывания антибиотика микроорганизмом, а также выявлять активные центры и структуры, обладающие избирательной чувствительностью [104, 114, 395]. В связи с этим антибиотики стали ценным орудием исследования при решении важнейших теоретических и практических проблем биохимии.

С помощью антибиотиков ведется изучение: 1) физико-химических закономерностей каталитического действия ферментов; 2) свойств изолированных ферментных систем, осуществляющих синтез макромолекулярных соединений, а также блокирующих отдельные этапы биосинтеза белка; 3) механизмов передачи наследственной информации на молекулярном уровне; 4) биохимических процессов, лежащих в основе физиологических механизмов развития или приспособления к изменениям внешней среды.

Расшифровка механизма действия пенициллинов и цефалоспоринов привела к выяснению состава и строения бактериальной оболочки. Ингибиторы синтеза клеточной оболочки у чувствительных к ним бактерий послужили средством для накопления в протоплазме клеток большого количества низкомолекулярных компонентов, из которых построены полимеры клеточных оболочек. Это значительно облегчило дальнейшее выделение и определение строения указанных «структурных единиц», входящих в состав полимеров.

Большинство антибиотиков, выделенных из грибов, принадлежат к высокоизбирательным неконкурентного характера ингибиторам биохимических процессов.

IX.9.1. ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ БАКТЕРИЙ

К этой группе относят пенициллины, цефалоспорины, циклосерин, бацитрацин и другие антибиотики, которые обладают высокой антибиотической активностью по отношению к грамположительным бактериям. Антибиотики избирательно ингибируют синтез клеточной стенки бактерий, что приводит к изменению формы бактериальных клеток (удлинение, набухание, образование длинных цепочек и шаров) и нарушению направленности биохимических процессов (накопление в

протоплазме клеток низкомолекулярных соединений — производных уридин-5-пирофосфата, N-ацетилмурамовой кислоты, пептида с определенной последовательностью аминокислот).

Микроскопическими методами изучают изменения морфологии чувствительных к соответствующим антибиотикам клеток бактерий, химическими — изменения характера синтеза и выделения «структурных единиц», из которых построены полимеры клеточных стенок.

IX.9.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ СФЕРОПЛАСТОВ ИЗ КЛЕТОК КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕНИЦИЛЛИНА

Бактерии инкубируют при встряхивании в МПБ с 20% сахарозы, 0,2% сернокислого магния и 100—1000 мкг/мл пенициллина при температуре 37°C [395]. Синтез клеточных стенок прекращается, а растущая протоплазма образует сферы, окруженные цитоплазматической мембраной. В течение 2 ч практически все клетки превращаются в сферопласты, что легко наблюдать с помощью фазово-контрастной микроскопии. Если сферопласты отмыть от пенициллина и продолжать их культивирование в гипертонической среде, они превращаются в обычные палочковидные формы, что указывает на сохранение в цитоплазматической мембране ферментных систем, синтезирующих полимеры клеточной стенки.

IX.9.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРИДИННУКЛЕОТИДОВ В КЛЕТКАХ СТАФИЛОКОККА, КУЛЬТИВИРУЕМОГО НА СРЕДЕ С ПЕНИЦИЛЛИНОМ

Клетки золотистого стафилококка, находящиеся в логарифмической фазе роста, инкубируют в питательной среде с пенициллином, после чего отделяют от среды и экстрагируют холодной 10%-ной ТХУ. После частичной очистки экстракта и удаления ТХУ количество уридиннуклеотидов определяют по модифицированной реакции Элсона — Моргана на аминсахара [395]. Накопление уридиннуклеотидов заканчивается через 1—2 ч, причем их количество повышается за это время в 50—100 раз по сравнению с исходным. Масса вновь обнаруженных метаболитов в максимальной точке накопления может составлять до 10% всей сухой бактериальной массы.

Антибиотики из актиномицетов изучены как ингибиторы синтеза белка и НК. Ниже кратко изложены эти сведения.

IX.9.2. ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА БЕЛКА

В эту группу включают антибиотики — хлоромидетин, стрептомицин, эритромицин, олеандомицин, которые ингибируют синтез белка, не разрушая синтеза НК. Действие антибиотиков — ингибиторов белкового синтеза было подтверждено разными учеными [104, 114, 395] с помощью различных методов на разных видах микроорганизмов [79, 104, 114, 395] в инкубационных смесях и бесклеточных системах [104, 114, 119, 395].

Среди антибиотиков этой группы наиболее полно изучен хлоромидетин, высокая избирательность действия которого на белковый синтез позволяет использовать его для разобщения процессов синтеза высокомолекулярных соединений. Поскольку синтез НК уже сформированными ферментными системами не подавляется антибиотиком, хлоромидетин используется для выявления механизма, контролирующего синтез РНК и ДНК.

Хлоромидетин нашел применение при исследовании процессов трансформации или трансдукции микробной клетки, при изучении системы фаг — хозяин. Антибиотик нарушает белковый синтез на стадии переноса аминокислот от аминоксил-РНК к синтезируемой белковой молекуле. Показателем ингибиции синтеза белка под влиянием хлоромидетина является изменение прочности связи ¹⁴С-меченых аминокислот с тРНК. Антибиотик тормозит включение в белки всех испытанных аминокислот.

**IX.9.2.1. ДЕЙСТВИЕ ХЛОРОМИДЕТИНА НА ВКЛЮЧЕНИЕ
В БЕЛКИ АМИНОКИСЛОТ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ
ИЗ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ (ПО РЭНДИ И ОЧОА) [395]**

0,5 мл каждого образца содержит (мкмоль) : 100 хлористого калия; 50 Трис-НСl буфера, рН 7,8; 5 хлористого магния; 40 меркаптоэтанолamina; 0,25 АТФ; 0,04 ГТФ; 6,7 фосфокреатина; 25 мкг креатинкиназы; 0,06¹⁴С-меченой аминокислоты (10 мкКи/мкмоль); концентрация

Т а б л и ц а 20. Включение
аминокислот в белки
в бесклеточной системе кишечной
палочки под влиянием
хлоромидетина

¹⁴ С-меченая аминокислота	Включенная радиоактив- ность, имп/мин		По- давле- ние, %
	без хлоромидетина	с хлоромидетин	
Аланин	124	40	68
Изолейцин	183	31	83
Лейцин	130	50	62
Тирозин	162	38	76
Валин	150	32	79

каждой из 19 немеченых аминокислот — 0,3 ммоль. Образец инкубируют 15 мин при температуре 37° С. Рибосомы кишечной палочки промывают 0,02 М раствором Трис-НСl буфера (рН 7,9), содержащим 0,01 моля хлористого магния (табл. 20).

**IX.9.3. ИНГИБИТОРЫ
СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ**

Эти антибиотики включают актиномицины, митомицины, новобиоцин, которые ингибируют синтез messenger-РНК (РНК-посредника) и вступают во взаимодействие с ДНК клеток. В связи с противоопухолевой активностью актиномицинов действие их на процессы метаболизма

изучают не только на микробных клетках, но и на опухолевых и нормальных клетках млекопитающих, а также в бесклеточных ферментных системах, отдельные компоненты которых имеют различное происхождение [104, 114, 395].

Актиномицины вызывают интерес у биохимиков, связанных с изучением биосинтеза НК. С этой целью наиболее широко используется антибиотик актиномицин D, образующий комплексы с гуанином ДНК и тем самым блокирующий ДНК как матрицу. Поэтому актиномицин D ингибирует ДНК-полимеразу и ДНК-зависимую РНК-полимеразу [143].

**IX.9.3.1. ДЕЙСТВИЕ АКТИНОМИЦИНА D НА ДНК-ПОЛИМЕРАЗУ
КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ**

Реакционная смесь содержит (мкмоль) : 0,2 препарата ДНК-полимеразы из клеток кишечной палочки (67-кратной степени очистки); ДНК-матрицу из тимуса теленка; 4 молекулы нуклеотидтрифос-

фата, в том числе H^3 -дезокситидинтрифосфат, меркаптоэтанол, хлористый магний, глициновый буфер, 1—30 мкг/мл актиномицина D [395].

Образование РНК на цепях ДНК изучают методом радиоавтографии с помощью уридина, меченного тритием [104, 114]. Комплементарную РНК выделяют из реакционной смеси методом хроматографии на колонках, состоящих из ДНК, закрепленной на целлюлозе или агаре, а также на колонках из фосфата кальция, метилированного альбумина, полиметакрилата магния, сефадекса, с последующей градиентной элюцией мочевиной. С этой целью широко применяют также хроматографию на бумаге и в тонком слое, зонный электрофорез, электрофорез в крахмальном геле, метод противоточной хроматографии и фотоэлектроколориметрию [66, 79, 119].

Локализацию НК в отдельных клетках или срезах ткани определяют с помощью гистохимических и цитохимических методов, включающих окрашивание различными красителями, специфичными для РНК и ДНК (по Фельгену); фотографирование в ультрафиолете; ультрафиолетовую микроскопию; количественную цитофотометрию; инфракрасную спектрофотометрию и др. [79].

IX.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ЖИДКОСТЯХ ОРГАНИЗМА И ДРУГИХ СУБСТРАТАХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Микробиологические методы определения присутствия антибиотиков в растворах и других субстратах (жидкости организма, биологический материал) сводятся к определению антибиотической активности их в отношении чувствительного тест-микроорганизма различными методами и их модификациями (метод диффузии в агар, метод серийных разведений и др. [119]).

В сыворотке крови. Применяют метод диффузии в агар с использованием чувствительных тест-микроорганизмов (см. IX.4.2). Набирают в пробирку 5 мл крови, соблюдая стерильные условия, и дают ей свернуться. Кровь центрифугируют, немедленно отсасывают сыворотку и переносят в другую пробирку. Хранят до применения в камере с сухим льдом или в рефрижераторе с глубоким замораживанием при температуре $-20^{\circ}C$ и ниже. Сыворотку вносят в цилиндрики без разведения или разводят до предполагаемой концентрации в ней антибиотика 7%-ным раствором бычьего альбумина. Контролем служит сыворотка крови животных, которым не вводили антибиотик.

В моче. Учитывая, что с мочой выделяется до 20% антибиотика, ее разводят стерильным физиологическим раствором или фосфатным буфером (рН 6,0) и испытывают методом диффузии в агар.

В тканях. Для определения антибиотиков в тканях их отделяют, удаляют остатки крови и фасций путем рассечения и промывания водой. Ткань взвешивают (сердце, легкое, селезенка, мозг, мышцы) и заливают 1—6 объемами или больше фосфатного буфера (рН 6,0) в зависимости от предполагаемого содержания антибиотика (масса/объем). Тщательно гомогенизируют в смесителе. Дают гомогенизату отстояться и исследуют надосадочную жидкость микробиологическим методом (см. IX.4.2). В качестве контроля служат органы и ткани неле-

ченных животных, так как ингибиторы роста микроорганизмов иногда присутствуют в нормальных тканях.

В молоке. Испытуемый образец молока вносят в цилиндрики неразведенным или разводят нормальным молоком, которое предварительно испытывалось на отсутствие ингибиторов роста. Определение антибиотиков в молоке проводят методом диффузии в агар (см. IX.4.2).

В кормах. 10 г образца корма растирают в ступке, помещают в стеклянный градуированный цилиндр с притертой пробкой и заливают (в зависимости от предполагаемого антибиотика) различными растворителями. Для определения пенициллина корма заливают 35 мл фосфатного буфера (рН 6,0), встряхивают 5 мин, дают осадку осесть, декантируют надосадочную жидкость в центрифужную пробирку. Повторяют эту операцию еще раз и присоединяют надосадочную жидкость к первому смыву. Определение проводят методом диффузии в агар.

Пенициллин является единственным из применяющихся антибиотиков, инактивирующимся специфическим энзимом — пенициллиназой. Поэтому, для того чтобы удостовериться, что обнаруженная активность принадлежит пенициллину, а не другим веществам, вызывающим задержку роста тест-микроба, образец должен быть разделен на две части, одну из которых обрабатывают пенициллиназой. Если образец, обработанный пенициллиназой, не образует зон задержки роста тест-культуры, то можно с уверенностью сказать, что зоны задержки роста тест-микроба, образующиеся при испытании образца, не обработанного пенициллиназой, обусловлены содержанием в корме (или другом субстрате) пенициллина.

Х. ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИНООБРАЗУЮЩИХ ГРИБОВ

Х.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Токсины грибов — метаболиты разнообразной химической природы, обычно небелковой, часто вторичные, оказывающие более или менее специфическое патологическое действие на организм человека, высших животных, растений и микроорганизмы.

Микотоксикозы возникают от употребления продуктов и кормов, пораженных следующими видами грибов: *Claviceps purpurea*, *Cl. paspali* — клавицепстоксикозы; *Stachybotrys alternans*, *St. atra*, *St. lobulata* — стахиботриотоксикоз; *Dendrodochium toxicum*, *D. caucasicum* — дендродохиотоксикоз; *Fusarium graminearum* — фузариограминеаротоксикоз; *F. sporotrichiella* — алиментарно-токсическая алейкия; *F. nivale* — фузарионивалетоксикоз и др.; *Aspergillus flavus* — аспергиллотоксикозы (афлатоксикоз), *A. fumigatus* — аспергиллофумигатотоксикозы, *A. ochraceus* — аспергиллоохраеотоксикозы; *Penicillium islandicum* — пенициллотоксикозы (пенициллоисландиотоксикоз), *P. rubrum* — пенициллорубротоксикоз, *P. urticae* — пенициллоуртицетоксикоз, *P. citreo-viride* — пенициллоцитреовиридетоксикоз, *P. viridicatum* — пеницилловиридикатотоксикоз; *Pithomyces chartarum* — спородесмиотсксикоз [48, 55, 363, 400, 419, 485, 789].

Этиологическое значение перечисленных видов токсинообразующих грибов в соответствующих заболеваниях было отмечено при употреблении в пищу или корм естественно пораженных ими субстратов и воспроизведено экспериментально. Кроме указанных видов известно свыше 150 видов токсинообразующих грибов разных таксономических групп, таких, как *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Helminthosporium*, *Gliocladium* и др. Однако значение каждого из них в патологии животного различно. Одни виды встречаются часто, другие — редко. Степень токсичности их также неодинакова [502, 525, 580, 614, 642, 647, 712, 765].

Токсины образуются при росте грибов на естественных субстратах и при культивировании. Изучение токсических грибов ведется в направлении токсико-микологического исследования урожая, продуктов, кормов, сырья, естественно пораженных токсинообразующими грибами, и определения токсигенных свойств грибов при их культивировании.

Х.2. ТОКСИКО-МИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УРОЖАЯ, ПРОДУКТОВ, КОРМОВ

Санитарно-микологический контроль кормов и продуктов питания включает отбор проб для исследования, органолептический анализ,

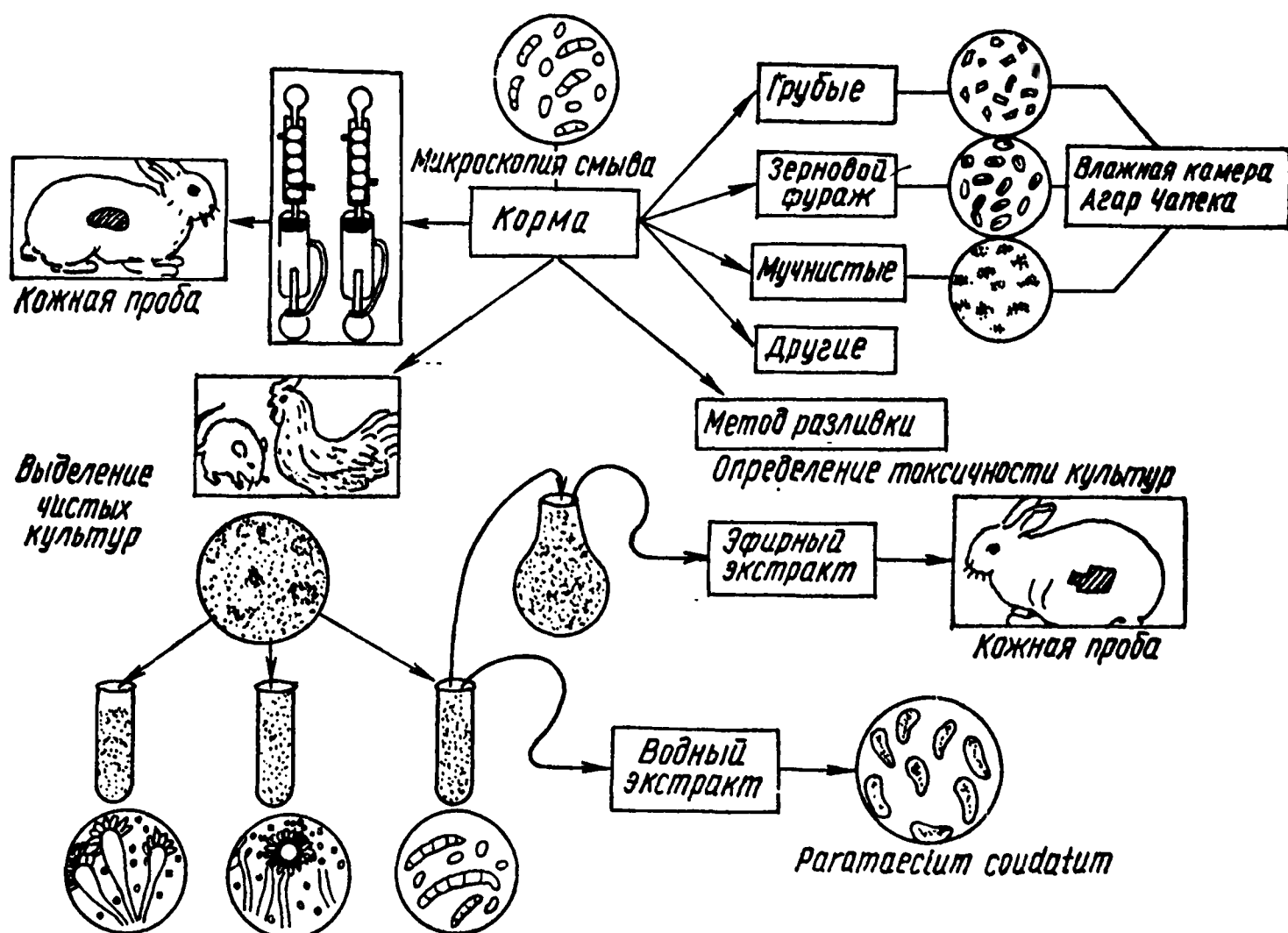


Рис. 108. Схема токсико-биологического анализа субстратов [420].

микологическое исследование, определение токсичности кормов выделенных культур грибов и осуществляется по схеме (рис. 108) [55, 243, 296, 299, 353, 419, 482].

Х.2.1. ОТЕОР ПРОБ

Для токсико-микологических исследований, как правило, используют определенную навеску корма — так называемую среднюю пробу. Масса образцов варьирует от 200 г до 1 кг. Масса пробы зерна комбикорма, рыбной муки, муки животного происхождения, отрубей, круп, жмыхов, шротов должна быть не менее 1 кг, силоса — 500 г, грубых кормов — 100 г. Если микологический анализ образцов корма связан с выявлением причины болезни животного, дополнительно исследуют остатки корма из кормушек, скирд и т. п. Кроме того, необходим осмотр места хранения продуктов или кормов для выявления возможных очагов «заплесневения» и отбора из них проб для дополнительного анализа. Образцы зерна, кормов и других субстратов снабжают этикеткой, в которой указывают номер образца, название корма, адрес хозяйства. В сопроводительном письме указывают причины, вызвавшие необходимость проведения микологического анализа корма.

Пробы упаковывают в мешочки и отправляют в лабораторию.

Перечень ГОСТов для отбора средней пробы разных видов кормовых продуктов

Зерно	ГОСТ 10 838—64
Семена масличных культур	ГОСТ 10 852—64
Мука и отруби	ГОСТ 9404—60
Комбикорма	ГОСТ 13 496—0—70
Травяная мука	} ГОСТ 8770—58
Хвойно-витаминная мука	
Белково-витаминные добавки	
Жмыхи, шроты	ГОСТ 139 790—68
Рыбная кормовая мука	ГОСТ 7631—55
Кормовая мука животного происхождения	ГОСТ 1857—53
Образцы сена	ГОСТ 4808—65

Х.2.2. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

При поступлении в лабораторию образца корма проводят прежде всего органолептический анализ, заключающийся в определении запаха, цвета, иногда вкуса, а также в установлении видимых признаков поражения грибами. Определяют запах целого и размолотого зерна. Для усиления запаха зерно согревают на ладони, заливают горячей водой или нагревают паром.

Небольшое количество корма (грубые корма, зерно и продукты его переработки, жмыхи, шроты) раскладывают на белой бумаге и исследуют при рассеянном свете. Грубые корма, пораженные грибами, могут иметь следующие признаки: потемнения, грибной налет разного цвета (черный, зеленый и др.), образование слежавшихся пластов. *Stachybotrys alternans* на соломе образует черный сажистый налет (сплошной или на узлах). Зерновые корма (ячмень, овес, пшеница и др.), пораженные грибами рода *Fusarium*, уменьшаются по массе и размерам, становятся морщинистыми, тусклыми, иногда приобретают розово-красную окраску или темнеют. При развитии *Aspergillus* и *Penicillium* зерно часто приобретает зеленые, серые, сизые оттенки.

По органолептическим показателям различают четыре степени поражения зерна: *первая* — солодовый запах, цвет внешних покровов и эндосперма не изменены, *вторая* — плесневело-затхлый запах, внешние покровы потемневшие, без блеска, эндосперм и зародыш при поражении их микроорганизмами могут быть темными; *третья* — плесневело-гнилостный запах, внешние покровы темные, эндосперм кремовый, зародыш поражен; *четвертая* — гнилостный запах, эндосперм коричневого цвета. Зернофураж третьей степени поражения используют для технических целей, четвертой степени — не годен для употребления.

Х.2.3. МИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРМОВ

Первичный анализ микофлоры заключается в изучении образца под бинокулярной лупой и микроскопическом исследовании препаратов, соскобов налета дерновинок, спороношений и т. д. При микологическом анализе устанавливают степень поражения образца, т. е. наличие в нем конидий токсинообразующих грибов и степень поражения субстрата. При сильной степени поражения наличие токсинообра-

вующих грибов можно определить визуально. Например, *St. alternans* образует на соломе сажистый, порошистый налет конидий гриба, которые хорошо видны в микроскопе.

Х.2.3.1. МИКРОСКОПИЯ СМЫВА

Зерно или мелко нарезанный грубый корм (солому, сено и т. п.) помещают в колбу с водой и взбалтывают в течение 20—30 мин. Полученную взвесь микроскопируют. Ее можно высевать на поверхность питательных сред для выделения грибов. Этим методом устанавливают наличие токсинообразующих спороносящих грибов и в основном определяют степень поражения зерна, продуктов или корма.

Х.2.3.2. МЕТОД НАКОПЛЕНИЯ

Метод используют для выделения грибов из зерна, грубых кормов, силоса, мучнистых кормов. Исследуемый образец выращивают в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге. Следует помнить, что излишнее увлажнение создает благоприятные условия для развития бактерий, которые задерживают рост многих видов грибов. Обычно на два-три слоя фильтровальной бумаги в чашки Петри диаметром 12 см наливают 5 мл стерильной воды. При подсыхании бумаги воду подливают.

Х.2.3.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ ИЗ ЗЕРНА

Заражение зерна грибами может быть поверхностным (заспoreние), когда споры гриба присутствуют исключительно на поверхности оболочки, и глубинным (поражение), когда гриб проникает через оболочку и развивается во внутренних частях зерна. Перед посевом зерно дезинфицируют. Для дезинфекции используют 3%-ный раствор формалина (за исходный берется 38—40%-ный раствор формальдегида) или другие препараты.

Зерно (не менее 50 штук), завернутое в марлевую салфетку, помещают в стаканчик или бюкс с дезинфектантом; через 2—3 мин его промывают в другом сосуде со стерильной водой, в которую для нейтрализации формалина добавляют 2—3 капли аммиака. Воду сливают, слегка раздвигают марлю и стерильным пинцетом раскладывают зерна равномерно в чашки Петри на фильтровальную бумагу таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом. Чашки Петри помещают в термостат при 24—25° С, периодически просматривают в течение 10, иногда 15 дней. При сильной степени поражения образцов обычно на 2—3-й день наблюдается обильный рост мицелия токсинообразующих грибов. Под бинокулярной лупой (× 25) мицелий или споры гриба осторожно переносят микологическим крючком в пробирку с суловым агаром. В дальнейшем изучают выделенный гриб в чистой культуре. На пробирках после посева мицелия или смыва конидий (в разведении) ставят порядковый номер анализируемого образца, порядковый номер пробирки и дату посева, а в журнале отмечают степень поражения субстрата и описывают особенности роста грибов.

Степень поражения зерна определяют в процентах по отношению количества поврежденных грибами зерен к их общему количеству в чашке (обычно не менее 200—400), а грубых кормов — по условной оценке (сильно пораженные, средне, слабо и т. д.). Метод накопления грибов на субстрате, помещенном на увлажненную фильтровальную бу-

магу в чашку Петри, является для некоторых видов токсинообразующих грибов элективным. Например, *Stachybotrys alternans* при поражении исследуемого субстрата обильно растет не только на нем, но и на фильтровальной бумаге и может быть легче выделен в чистую культуру. *Dendrodochium toxicum*, *D. caucasicum* нередко образуют на субстрате типичные черно-оливковые слизистые спородохии, их также можно определить при микроскопировании и пересевом из спородохии выделить в чистую культуру. Токсинообразующие виды фузариев, например *F. sporotrichiella*, растут в виде тонкого, паутинистого, порошистого мицелия вследствие обильного спорообразования, *F. graminearum* нередко образует на зерне спородохии. Зерно, пораженное фузариями во время вегетации растений, часто щуплое, светло-розово-красно-коричневого оттенка, нередко с поверхностными спородохиями телесного, розового или оранжевого цвета.

Х.2.3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ ИЗ СИЛОСА, ЖМЫХА И МУЧНИСТЫХ КОРМОВ

Нарезанный силос раскладывают (по 10 кусочков) на поверхности агаризованной среды в чашки Петри. Так же сеют и жмыхи, предварительно измельчив их. Для выделения грибов из мучнистых кормов (муки, отрубей, комбикорма, шрота, мясокостной и рыбной муки) пользуются методом непосредственного посева и методом разведения.

10 г мучнистого корма помещают в стерильную колбу, куда добавляют 90 мл стерильной воды и получают основное разведение (1 : 10). Колбу с содержимым взбалтывают в шуттель-аппарате или вручную в течение 15—20 мин. Из основного разведения готовят разведения 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000 и т. д. на стерильной воде. Степень разбавления основной взвеси зависит от содержания в корме спор грибов. Комбикорм сеют обычно в разведении 1 : 1000 в 5 чашек Петри, при большей степени поражения грибами — в разведении 1 : 10 000 в 8—10 чашек. Разведения готовят с помощью стерильных пипеток; для каждого разведения рекомендуется брать отдельную пипетку. По 1 мл готового разведения вносят в чашки Петри. При этом материал распределяют каплями на дне чашки; в чашки заливают по 10 мл расплавленной агаризованной остуженной до 40—45° С среды. Круговыми движениями чашек материал равномерно распределяют в агаре. Посевы всех видов кормов культивируют при температуре 22—25° С. Чашки просматривают на 3-, 5-, 9-й день после посева. Рекомендуется посевы выдерживать дополнительно 2—3 дня для выявления медленно развивающихся форм.

Количественный учет грибов. Подсчет колоний начинают на 2—3-й день после посева. Для облегчения подсчета дно чашки размечают карандашом на секторы или используют счетную камеру Вольфюгеля. Проводят 2—3 последовательных подсчета с интервалом в 2 дня. Общее количество зародышей данного вида гриба определяют в пересчете на 1 г исследуемого корма с учетом его разведения. Подсчет сопровождается дифференциацией грибов и выделением их в чистую культуру для дальнейшего изучения и определения их токсинообразующей способности.

Х.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЗЕРНА, ПРОДУКТОВ, КОРМОВ, ПОРАЖЕННЫХ ГРИБАМИ

Исследования проводят в основном тремя способами: алиментарной пробой на лабораторных животных, постановкой «кожной» пробы, специфическими физико-химическими методами.

Х.2.4.1. АЛИМЕНТАРНАЯ ПРОБА НА ЖИВОТНЫХ

К токсическим веществам грибов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* и других чувствительны мыши, морские свинки, кролики, кошки, куры, особенно цыплята, голуби и утята. Токсичность кормов и продуктов питания определяют путем скармливания их цыплятам 5—15-дневного возраста, утятам 1—10-дневного возраста, молодым мышам массой 20—25 г, а при определении грубых кормов — молодым морским свинкам и кроликам. Суточную норму кормов заменяют исследуемым кормом и скармливают его подопытным животным в течение, не менее 10 дней. Токсикоз проявляется быстрее, если пораженный корм скармливать животным натошак; для этого перед опытом животных не кормят 5—10 ч (воду дают в неограниченном количестве). В опыте используют 3—6 животных. За подопытными животными ведут ежедневные клинические наблюдения. В зависимости от степени токсичности и количества съеденного животными корма, пораженного грибами, заболевание и гибель их могут наступать в различные сроки.

Скармливание резко токсичного (фузариозного или пораженного токсическими аспергиллами и пенициллами) зерна вызывает заболевание и гибель животных на 1—3-й день с клиническими признаками поражения центральной нервной системы (дрожь, судороги, параличи). Цыплята (5—10-дневные) и голуби отличаются высокой чувствительностью к токсическим веществам грибов. Характерными клиническими признаками отравления цыплят токсичным фузариозным зерном являются сонливость, нередко понос. Характерный признак токсикоза у голубей — рвота.

Положительными показателями токсичности кормов при постановке биопробы на животных являются: потеря массы, расстройство желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы, у птиц — цианоз гребня и сережек, развитие анемии. Резко токсичные образцы кормов могут вызывать гибель подопытных животных без проявления клинических признаков отравления [46, 301, 400, 420].

Токсичность жмыхов, шротов и кормов животного происхождения определяют введением водной взвеси (1 : 2 или 1 : 3) исследуемого образца непосредственно в желудок. Мышам в течение 3 дней через зонд вводят натошак по 0,5 мл непосредственно в желудок вытяжку из корма. В качестве зонда можно использовать одетую на шприц тупую, слегка согнутую иглу. Этим методом можно определить токсичность и других кормов. Токсичность корма и продуктов определяют по времени гибели мышей и количеству введенной вытяжки из исследуемого образца.

Х.2.4.2. КОЖНАЯ ПРОБА НА КРОЛИКЕ

Этим методом определяют токсичность зернофуража, продуктов питания, грубых, комбинированных кормов. Токсичность шрота, жмыха, кормов животного происхождения определяют другими методами.

Готовят экстракт из исследуемого образца. Для этого 50 г измельченного корма помещают в пакеты из фильтровальной бумаги и экстра-

гируют в аппарате Сокслета эфиром (петролейным или серным) или другим органическим растворителем в течение 6 ч. Экстракт переносят в выпарительную чашку или бюкс и испаряют в вытяжном шкафу при комнатной температуре до исчезновения запаха растворителя.

При отсутствии аппарата Сокслета 50 г измельченного корма помещают в стеклянные 0,5-литровые банки с притертой пробкой и заливают эфиром, спирто-эфиром (1 : 3), бензолом или метанолом так, чтобы жидкость покрывала пробу на 2—3 см. Экстрагируют в течение 24 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая. Затем жидкость сливают через бумажный фильтр в выпарительную чашечку и оставляют в вытяжном шкафу до полного испарения растворителя. Экстракт зерна имеет вид растительного масла, экстракт грубых кормов — крошковатую консистенцию, поэтому перед постановкой кожной пробы в него добавляют 2 капли растительного масла или рыбьего жира.

В качестве подопытных животных используют кроликов (серых, белых) массой не менее 1,5—2 кг с непигментированной кожей. За несколько часов до постановки опыта кроликам выстригают шерсть на боках до полного оголения кожи на участке размером 3 × 6 см (на каждом боку допускается делать не более 3 проб). На оголенную, неповрежденную поверхность кожи кролика наносят экстракт и слегка втирают его в кожу стеклянным шпателем или палочкой. Экстракт наносят двукратно с интервалом в 24 ч. Для предупреждения слизывания нанесенного экстракта на шею кролика надевают фанерный, картонный или резиновый воротник. За животными ведут ежедневные наблюдения.

Реакцию учитывают ежедневно. Воспалительный процесс на коже кролика развивается на 1—2-е сут после нанесения экстракта, усиливается на 4—5-е сут, достигает максимума иногда на 7-е сут. В отдельных случаях эти сроки могут варьировать. При учете реакции на коже кролика определяют глубину и характер поражения кожи, так как это позволяет судить о степени токсичности корма, а следовательно, рационально использовать его.

Различают четыре степени интенсивности воспалительной реакции после нанесения экстракта [420]: *первая* — покраснение, повышенная чувствительность кожи, шелушение, исчезающие через 1—2 дня после нанесения экстракта (корм очень слабо токсичный); *вторая* — покраснение, болезненность, незначительное утолщение кожи, мелкие одиночные с просяное зерно или меньше желтоватые пузырьки; затем на их месте образуются тонкие корочки подсохшего экссудата, шелушение (корм слабо токсичный); *третья* — покраснение, сильное утолщение, болезненность, складчатость кожи; на всей поверхности образовавшегося очага возникают темноватые пузырьки, затем поверхностный сухой некроз, иногда язвы, сплошной тонкий струп (токсичный корм); *четвертая* — покраснение, сильный отек, выступающий в виде массивного вала на нижней границе очага; глубокий сухой некроз, образование долго незаживающих язв, струп толстый и сплошной (корм резко токсичный).

Контролем служат экстракты доброкачественного зерна или другого субстрата. Отдельные виды токсинообразующих грибов не оказывают дерматонекротического действия, например патулин и некоторые др.

А.2.4.3. ГЛАЗНАЯ ПРОБА

Измельченный корм заливают водой в соотношении 1 : 10. После 24-часового экстрагирования фильтруют через марлю, а затем через бумажный фильтр. Контролем служит водный экстракт из доброкачественного зерна. Подопытному животному в конъюнктивальный мешок одного глаза вводят по 5 капель исследуемой вытяжки с интервалом 5 мин в течение часа. Во второй глаз вводят контрольный экстракт. Через час после введения токсичного экстракта отмечается расширение зрачка на 3—4 мм, которое сохраняется в течение 5—6 ч. Контрольная вытяжка вызывает кратковременное расширение зрачка на 1—2 мм. Эта проба разработана в основном для определения токсинов грибов рода *Fusarium* [374]. Метод применяют для определения токсичности *Pithomyces chartarum*, выделяющего споридесмин. Введение этого вещества в глаз кролику вызывает поражение роговицы и косоглазие [243].

Х.2.4.4. ПРОБА НА БОРОДКАХ КУР

Измельченный корм заливают эфиром или спирто-эфирной смесью в соотношении 1 : 2 или 1 : 3, экстрагируют в течение 24 ч, фильтруют, растворитель испаряют. Маслянистый экстракт (0,1—0,2 мл) вводят в одну из бородак курицы. В другую бородку вводят экстракт из доброкачественного зерна. Реакцию учитывают по развитию воспалительного процесса, отека, кровоизлияний и некроза на месте введения. Толщину бородаки измеряют кутиметром [63].

Х.2.4.5. ПРОБА НА МЫШАХ

Навеску исследуемого корма (200—250 г) измельчают и заливают подкисленной эфиро-спиртовой смесью (200 мл эфира + 100 мл спирта + 1 мл концентрированной соляной кислоты). Экстрагируют в течение 2—3 сут в холодильнике, растворитель отфильтровывают. Фильтрат выпаривают до исчезновения запаха растворителя. К 0,5—1 мл жирового экстракта добавляют 4,5—9 мл стерильного нейтрального масла и тщательно перемешивают.

Мышам вводят подкожно по 0,5 мл исследуемого экстракта, контроль — 0,5 мл нейтрального масла. От резко токсичных кормов мыши погибают через 6—12 или 48 ч. Слабо токсичные корма вызывают развитие некрозов в месте введения. У контрольных животных не наблюдается никаких изменений [243].

Х.2.4.6. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ КОРМОВ

Для химического определения используют экстракты токсинов из кормов, пораженных токсинообразующими грибами. Большинство методов разработано для кормов, пораженных грибами рода *Fusarium*, *Aspergillus flavus*, *Stachybotrys alternans*. Для обнаружения микотоксинов обычно используют следующие реактивы: 1%-ный раствор паранитроанилина [74]; судан III; 0,1%-ный раствор осмиевой кислоты; фуксинсернистую кислоту, едкий натр [337]; о-дианизидин, ТХУ [63].

Х.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ ГРИБОВ

Токсичность неидентифицированных видов грибов на первом этапе исследования определяют описанными выше способами. Признаки заболевания, характер действия токсина, его природу и свойства устанавливают с помощью клинических, патологоанатомических, химических, фармакологических, медицинских или ветеринарных методов исследования. Выделение токсичного вида гриба из общего числа выделенных должно основываться на тщательном анализе результатов микологических исследований: динамике роста гриба, степени заспоренности, пораженности образца и т. д.

Хронические алиментарные опыты на животных проводят с теми видами грибов, которые при скармливании лабораторным животным корма, зараженного испытуемым видом гриба, вызывают характерные клинические и патологоанатомические признаки токсикоза. Токсигенные свойства грибов определяют также посредством внутрибрюшинного введения белым мышам экстрактов грибов или культуральной жидкости (0,5—1 мл).

Следующим этапом исследований является экспериментальное воспроизведение заболевания на определенных видах животных. При постановке этих опытов учитывают способ искусственного заражения корма изучаемым видом гриба, степень его токсичности, дозу и многие другие факторы. На этом этапе исследований проводятся также острые и хронические алиментарные опыты, которые включают обширную программу клинических наблюдений, физиологических, гематологических исследований. Положительные результаты на этом этапе изучения позволяют считать гриб, используемый для заражения скармливаемого опытным животным корма, этиологическим фактором заболевания.

Изучение токсинообразующих грибов связано с применением многих методов и способов получения и введения животным экстрактов из искусственно зараженного данным грибом корма или культуры гриба, изоляции действующего начала, определения его состава и структуры, фармакологических и других свойств, судьбы в организме, разработки методов предупреждения заболевания, его лечения и др. Эти исследования в значительной степени связаны с культивированием токсинообразующих грибов.

Х.3.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ

В качестве сред для искусственного заражения чистыми культурами грибов могут быть использованы в зависимости от целей опыта самые разнообразные субстраты. Зерно хлебных злаков употребляют чаще других. Наилучшее токсинообразование у различных видов грибов и накопление токсических веществ происходят на тех субстратах, на которых они развиваются в естественных условиях. Для культивирования *Stachybotrus alternans* используют солому, овес, видов родов *Penicillium*, *Trichoderma* — ячмень, горох, кукурузу, смесь ячменя с горохом (3 : 1), видов родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Dendrodochium* и других — овес, ячмень, пшено, кукурузу. Зерно, используемое для посева грибов, должно быть доброкачественным.

Х.3.1.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ НА ЕСТЕСТВЕННЫХ СУБСТРАТАХ

В колбы, матрасы емкостью 1—1,5 л насыпают до 200 г зерна, до 50 г грубых кормов. Корма, предназначенные для заражения грибами, увлажняют водой и стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 40 мин. Стерилизацию проводят двукратно. Еще горячие колбы с зерном хорошо встряхивают, чтобы разбить образовавшиеся комочки на отдельные зерна.

Для приготовления сред существуют многочисленные прописи. При использовании увлажненного зерна хлебных злаков, мелко нарезанных кусочков соломы или других видов корма следует избегать сильного увлажнения; готовая среда должна быть рыхлой, состоящей из отдельных зерен или соломинок. Это создает хорошую аэрацию, увеличивает поверхность поражения мицелием гриба, т. е. благоприятствует обильному прорастанию субстрата мицелием гриба.

Для приготовления споровой взвеси используют чистые культуры грибов, выращенные на агаре Чапека или сусло-агаре. В пробирку с культурой наливают 3—5 мл физиологического раствора или 0,02%-ного раствора Твина-80, встряхивают и взвесью с определенным количеством спор в 1 мл засевают сосуды со средой.

Х.3.1.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Для накопления токсических веществ в питательной среде можно использовать среду Чапека, Чапека — Докса, Бодена — Готье, жидкое сусло, глюкозо-аммонийно-нитратную среду Брайна, среду Чапека с добавлением сахарозы, крахмала, мальтозы, глюкозы, фруктозы, глицерина и др. Культивирование токсинообразующих грибов на жидких питательных средах можно проводить как поверхностным, так и погруженным методом. При поверхностном культивировании на поверхность среды, разлитой в колбы, аккуратно высевают определенное количество спор исследуемой культуры. Культивирование проводят в термостате при 25—27° С в течение 10—25 дней. При погружном культивировании в среду вводят споровую взвесь исследуемой культуры в 0,02%-ном растворе Твина-80 (определенный объем от объема питательной среды). Густоту посева контролируют путем подсчета числа конидий в 1 мл среды в счетных камерах Горяева, Предтеченского, Тома и др. (см. раздел II.1.3.1). После засева колбы помещают на круговые качалки (220 об/мин) и культивируют при температуре 25—27° С. Метод глубинного культивирования способствует быстрому росту грибов и ускоряет процессы токсинообразования до 3—5 сут.

Длительность культивирования токсинообразующих грибов на зерне и при поверхностном культивировании на жидких питательных средах зависит от вида грибов. Обычно интенсивный рост гриба сопровождается максимальным накоплением токсических веществ. Сроки культивирования также определяются видом гриба: *St. alternans* — 8—25 дней; *Fusarium*, *Trichoderma*, *Dendrodochium* — 10—25 дней; *Aspergillus*, *Penicillium* — 10—15 дней; *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria* — 15—20 дней. В дальнейшем в зависимости от цели исследования чистой культуры гриба, выращиваемой на зерне или жидкой питательной среде, готовят различные экстракты.

Х.3.1.3. ИЗОЛЯЦИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Для экстрагирования токсических веществ грибного происхождения чаще всего используют петролейный эфир, гексан, бензол, четыреххлористый углерод, этиловый эфир, хлороформ, этилацетат, хлористый метилен, ацетон, метанол, ацетонитрил, смеси хлороформ — метанол (2 : 1), этиловый эфир — этанол (2 : 1), этиловый эфир — метанол (2 : 1), хлороформ — этанол (2 : 1).

Растворимость токсических веществ и условия их извлечения определяют дальнейшее изучение природы токсина — биологические и физико-химические методы определения токсичности грибов. Токсические вещества *Aspergillus flavus* наиболее полно извлекаются метанолом, ацетоном, петролейным эфиром, бензолом, этанолом и ацетонитрилом; *A. fumigatus* — бензолом, хлороформом, ацетоном, метиленом хлористым и ацетонитрилом; *F. rosea* — этиловым эфиром, метанолом, смесью хлороформ — метанол (2 : 1) [43, 294].

Токсические вещества из культуры гриба на зерне экстрагируют эфиром, спирто-эфиром (1 : 3), ацетоном, хлороформом. Из культуральной жидкости токсические вещества экстрагируют растворителями (в соотношении 10 : 1). Экстрагирование повторяют трижды (по 15 мин), растворитель отделяют от культуральной жидкости с помощью делительной воронки, и все экстракты соединяют. Растворитель отгоняют через холодильник на водяной бане при 60° С или выпаривают из испарительной чашки до исчезновения его запаха. Сухой остаток взвешивают и вновь растворяют в одном из растворителей, чаще всего в спирте-ректификате. Эта спирторастворимая фракция токсического комплексного вещества может быть использована для качественного и количественного определения токсичности грибов.

Х.3.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ГРИБОВ

Эти методы применяют для определения токсичности грибов или препаратов токсинов, получаемых при культивировании токсинообразующих грибов, а также для определения токсичности продуктов или кормов. Токсичность грибов определяют на парameциях, микроорганизмах, яйцах моллюсков, рыбах, лягушках, эмбрионах птиц, культуре ткани. На лабораторных животных определяют летальную дозу токсина.

Х.3.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПРОСТЕЙШИХ

Метод применяется для первичного определения токсичности культур грибов (не идентифицированных), водных экстрактов грибной пленки, культуральной жидкости и кормов. В качестве тест-объекта чаще всего используют чистую культуру *Paramecium caudatum* или *Tetrahymena pyriformis*, которую получают из природных водоемов перевивкой под лупой тонкой пипеткой одной парameции на питательную среду. Для этого готовят сенной настой: 1—2 части сена кипятят в колбе для удаления зародышей неспоровых бактерий и других микроорганизмов, настаивают при комнатной температуре (20—25° С) около 3 дней для развития сенной палочки и в эту среду (нейтральная реакция), в обилии содержащую клетки *Bacillus subtilis*, вносят парameции. Парameции обычно растут в виде пленок на поверхности у стенок. Парameции пересевают на новую среду каждые 1—2 месяца.

Можно использовать молочную среду: к 15—20 мл остывшей кипяченой воды прибавляют 2—3 капли сырого снятого коровьего молока. Развивающиеся молочнокислые бактерии являются кормом для парameций. 1—2 раза в месяц к среде добавляют молоко. Чистые культуры парameций необходимо постоянно поддерживать и периодически обновлять.

Последовательность определения. На предметное стекло градуированными микропипетками наносят две капли экстракта гриба или культуральной жидкости и 1 каплю жидкости с парameциями. Все три капли должны быть одинакового объема. Предметное стекло помещают в чашку Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой (влажная камера). Наблюдение за поведением парameций начинают через несколько минут и продолжают не менее 4 ч.

Критерием для определения токсичности служит время гибели парameций от воздействия испытуемого экстракта, которую констатируют по полному прекращению их движения и распаду. При действии экстракта резко токсичных грибов гибель парameций наступает через 3 мин, токсичных — 8—20 мин; слабо токсичных — через 2 ч [243, 420]. Нетоксичные штаммы грибов не вызывают гибели или каких-либо морфологических изменений парameций даже после 24-часового воздействия.

Парameции проявляют высокую чувствительность к микотоксинам.

Х.3.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМАХ

При определении токсичности грибов этим методом необходимо соблюдение правил стандартизации: определенный штамм тест-культуры, среда для культивирования и испытания, температура культивирования, возраст культуры микроорганизма, метод испытания (чашечный или титрация), густота взвеси для посева и др.

Для определения дендродохина в качестве тест-культуры используют *Candida stellatoidea* 62, *Saccharomyces vini* «Ф», выращенные на сусло-агаре. К афлатоксинам чувствительны *Bacillus megaterium* и *Bac. subtilis*; 1 мкг афлатоксина задерживает рост данных культур через 7 ч после введения. При использовании триптоглюкозо-дрожжевого 1%-ного агара, а для газона — культуры *Bac. subtilis*, содержащей $1 \cdot 10^{10}$ спор/мл [597], патулин ингибирует рост этой культуры при концентрации 4—8 мкг. Для определения стахиботриотоксина используют *Azotobacter* на среде Эшби, фузариотоксина — *Saccharomyces fragilis* 25-D на сусло-агаре [47, 127], фумигатотоксина — культуру *Staphylococcus aureus* 209 на МПА.

Качественный метод определения микотоксинов основан на образовании зон ингибиции роста тест-культуры на поверхности газона. Исходные культуры пересевают не чаще раза в месяц. Для анализа используют суточные бульонные культуры. Определение токсичности проводят чашечным методом с помощью бумажных дисков или цилиндров. Каплю взвеси суточной культуры тест-микроорганизма тщательно растирают по поверхности агара в чашке Петри. Затем культуральную жидкость или растворы исследуемого токсина определенной концентрации (0,01 мл) наносят на бумажные диски или в цилиндрики, расставленные на агаре с газоном тест-культуры. Чашки с испытуемыми культурами выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста тест-микроорганизма, — 24 ч (если тест-организм —

бактерия) и 48 ч (если тест-организм — гриб и дрожжи). При наличии в испытуемом образце токсина вокруг бумажного диска образуется зона задержки роста тест-микроорганизма. Методом серийных разведений определяют количество токсина (антибиотика) не только в условных единицах разведения, но и в весовых единицах (см. IX. 4.1.). Интенсивность роста *Saccharomyces vini* в присутствии дендродохина различной концентрации можно определить нефелометрически. Чувствительность метода — 0,03—0,008 мкг/мл дендродохина [118].

Х.3.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ЯЙЦАХ МОЛЛЮСКОВ

Токсичность афлатоксина определяют по задержке деления оплодотворенных яиц моллюска *Bankia setacea*. Чувствительность метода — 0,05—40 мкг/мл афлатоксина. Из гонадальной ткани взрослых особей моллюсков извлекают яйца и сперму, суспендируют в морской и водопроводной воде, содержащей различные концентрации афлатоксина, и инкубируют при 10—20° С. В контроле (без афлатоксина) через 2 ч развивается двухклеточная стадия, через 3—4 ч — многоклеточная и примерно через 18 — свободно плавающие трихофоры. При наличии афлатоксина задерживается образование клеточной оболочки, в результате чего через 3—5 ч развиваются клетки, содержащие несколько ядер.

Наличие или отсутствие трихофор является критерием действия афлатоксина [805].

Х.3.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА РЫБАХ

Для определения афлатоксина в кормах используют яйца и личинки рыбы-зебры (*Brachydanio rerio*). Введение 1 мкг/мл афлатоксина вызывает ненормальное движение личинки через 30 мин и приводит к их гибели через 5—6 ч [496]. Токсичность зернофуража определяют на аквариумных рыбах гуппи. Пробу зернофуража (50 г) тщательно измельчают, помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 100 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шутель-аппарате в течение 2 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку (экстракты из кукурузы и проса фильтруют дважды) и выпаривают досуха под тягой на водяной бане (55—60° С). Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и переносят его в сосуд с 500 мл воды из аквариума (17—20° С). В раствор помещают 5 гуппи независимо от пола и возраста. Наблюдение ведут в течение

Т а б л и ц а 21. Оценка степени токсичности исследуемого корма [244]

Степень токсичности корма	Количество погибших гуппи		Время гибели, ч
	шт.	%	
Не токсичен	Не более 1	До 20	До 24
I (очень слабо токсичен)	2—3	40—60	12—24
II (слабо токсичен)	4	80	4—8
III (токсичен)	5	100	2—4
IV (резко токсичен)	5	100	1

24 ч и отмечают гибель гуппи через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч (гуппи, вышедших из опыта, выбраковывают). Время гибели гуппи зависит от токсичности исследуемого зернофуража (табл. 21) [244]. В качестве контроля используют 1%-ный водный раствор ацетона, в котором гуппи в течение 3 сут остаются живыми.

Х.3.2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА СЕРДЦЕ ЛЯГУШКИ

В этом методе используют культуральную жидкость или экстракт токсина в разведении 1 : 1000 и 1 : 10 000 на растворе Рингера — Локка (рабочий раствор). Минимальные концентрации, действующие на сердце лягушки, — 30—35 мг. Сердце лягушки изолируют по методу Березина. Изменения в деятельности сердца контролируют кимографом.

При наличии токсических веществ в испытуемом растворе через 7—10 мин после его введения нарушается ритм работы сердца. Экстракты грибов фузариум вызывают учащение или замедление ритма сердечных сокращений с последующей остановкой сердца в диастоле. Экстракты дендродохина в разведении 1 : 1000 вызывают тахикардию, а затем аритмию [276].

Х.3.2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ЭМБРИОНАХ ПТИЦ

Куриные эмбрионы как биологический тест были применены для изучения афлатоксинов В₁, В₂, G₁, G₂ (отдельно и в смеси), выделенных из экстрактов арахисовых продуктов и растворенных в пропиленгликоле, который не токсичен для куриных эмбрионов. При введении афлатоксина в желток используют 5-дневные эмбрионы, в воздушную пугу — 1-дневные, в хорионаллантоисную оболочку — 9-дневные.

Введение экстракта в желток (рис. 109). Делают отверстие в скорлупе над воздушной пугой и тонкой длинной иглой (под овескопом) вводят в желточный мешок 0,5 мл исследуемого экстракта с заданной концентрацией афлатоксина. Затем отверстие заклеивают и лоток с эмбрионами помещают в термостат.

Введение экстракта в воздушную пугу (см. рис. 109). Перед инъекцией афлатоксина яйца просматривают и карандашом отмечают линию воздушного мешка, делают отверстие диаметром около 5 мм в скорлупе над воздушным мешком. До 0,04 мл (или меньше) исследуемого раствора с заданной концентрацией афлатоксина вносят на мембрану яйца и отверстие заклеивают пластырем. Эмбрионы инкубируют в термостате при 37° С и 52%-ной относительной влажности воздуха.

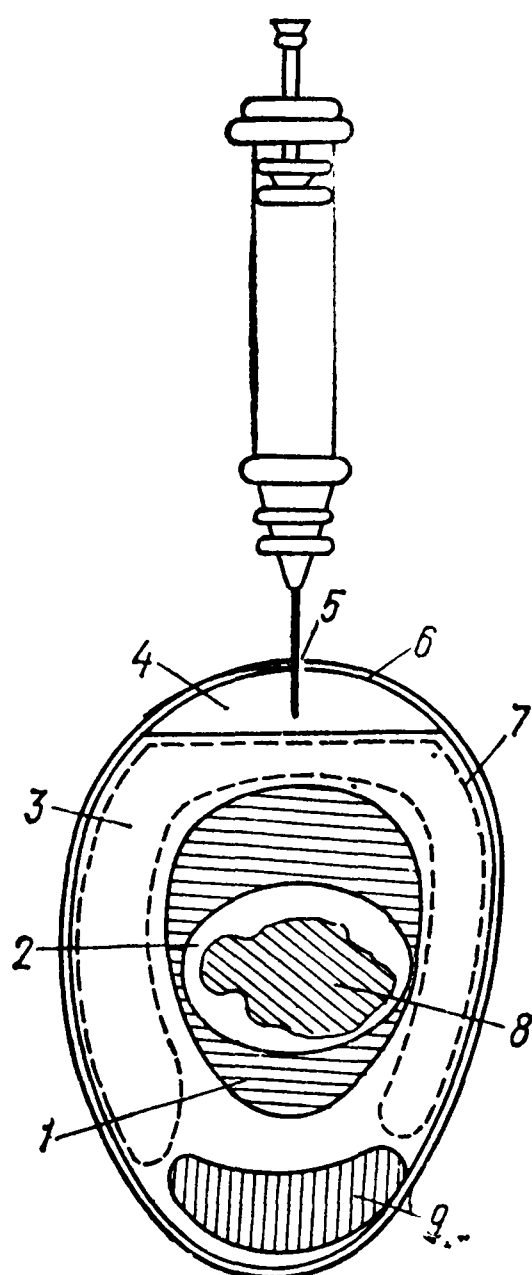


Рис. 109. Введение токсина в воздушный мешок эмбриона:

1 — желток; 2 — амнион; 3 — аллантоисная полость; 4 — воздушное пространство; 5 — отверстие в скорлупе; 6 — подскорлупная оболочка; 7 — хорионаллантоисная оболочка; 8 — плод; 9 — белок.

Введение афлатоксинов в желток и воздушную пугу вызывает задержку роста и развития зародыша, гибель которого обычно происходит на 5—10-е сут. Если зародыш выживает дольше, то он не вылупляется. При вскрытии устанавливают отеки, кровоизлияния и недоразвитие мозга, пятнистость и дегенеративные изменения печени, недоразвитие или отсутствие клювика, укорочение ног, уплотнение перьевого покрова.

ЛД₅₀ афлатоксина В₁ при введении в желток — 0,048 мкг, а при введении в воздушную пугу — 0,025 мкг на яйцо; ЛД₁₀₀ — 0,1 мкг.

Введение в хорионаллантоисную оболочку (см. рис. 109). Метод предложен А. Т. Ивановым (1967 г.). По 0,2 мл исследуемого экстракта заданной концентрации вводят в хорионаллантоисную оболочку тонкой иглой через отверстие, которое делают в скорлупе над воздушной пугой, контролируя правильность введения под овескопом. Для определения гибели зародыша яйца просматривают под овескопом 2 раза в сутки. Наблюдение за эмбрионами ведут в течение 21 сут. Биологическое действие микотоксинов определяют по патологоанатомическим изменениям и выживаемости эмбрионов.

Токсичные экстракты вызывают гибель зародыша через 18 ч после введения. При этом хорионаллантоисная оболочка утолщена, гиперемирована, с точечными и полосчатыми кровоизлияниями; зародыш гиперемирован. Слаботоксичные экстракты вызывают гибель эмбрионов через 20—25 ч после введения. Хорионаллантоисная оболочка с точечными кровоизлияниями, зародыш гиперемирован, внутренние органы дряблые, кровенаполненные, печень увеличена. Очень слаботоксичные экстракты вызывают гибель эмбрионов через 30—90 ч после введения. Кровеносные сосуды хорионаллантоисной оболочки спавшиеся, зародыш гиперемирован, особенно головка и крылья, печень мраморная, почки кровенаполненные, сердечная сорочка с кровоизлияниями [243].

Х.3.2.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ

Метод используется главным образом для изучения цитологического и биохимического действия токсинов.

Получение эмбриональных тканей. Для получения первичных культур обычно используют 7—12-суточные эмбрионы цыплят и утят. Эмбрионы извлекают из скорлупы в стерильных условиях, переносят в чашку Петри и удаляют глаза. Промывают эмбрионы солевым раствором, измельчают на кусочки размером 1—2 мм, снова промывают и используют для выращивания фиксированных или однослойных культур. Можно использовать отдельно органы или ткани эмбриона для получения соответствующих культур. Эмбриональные ткани млекопитающих получают от мышей, кроликов, крыс. Беременных животных забивают, по возможности асептически извлекают эмбрион, отмыывают от крови, измельчают так же, как куриные эмбрионы.

Существует несколько методов культивирования клеток, органов, тканей.

Во флакон наливают несколько миллилитров плазмы крови кур, чтобы покрыть дно, затем плазму отсасывают и петлей вносят 40—60 кусочков ткани, равномерно распределяя их по дну. После свертывания плазмы во флакон наливают питательную среду, закрывают пробками и помещают в термостат при 37° С. Среду меняют в зависимости от степени роста через 3—15 сут, пересевают каждые 3—30 сут. При пересеве культуры извлекают из флакона в чашку Петри и выре-

зают кусочки реэксплантации. Используют стационарный и погруженный методы выращивания.

Получение однослойных первично трипсинизированных культур клеток. Диспергируют кусочки ткани с помощью ферментов до получения суспензии отдельных клеток, которые растут на внутренней поверхности сосуда (пробирки, флакона). После промывания и измельчения ткани ее обрабатывают трипсином, который разрушает вещества, связывающие клетки. В результате получается взвесь отдельных клеток. Обычно для полной дезагрегации клеток ткани применяют 0,25%-ный солевой раствор трипсина (чаще раствор Дифко) или его смесь

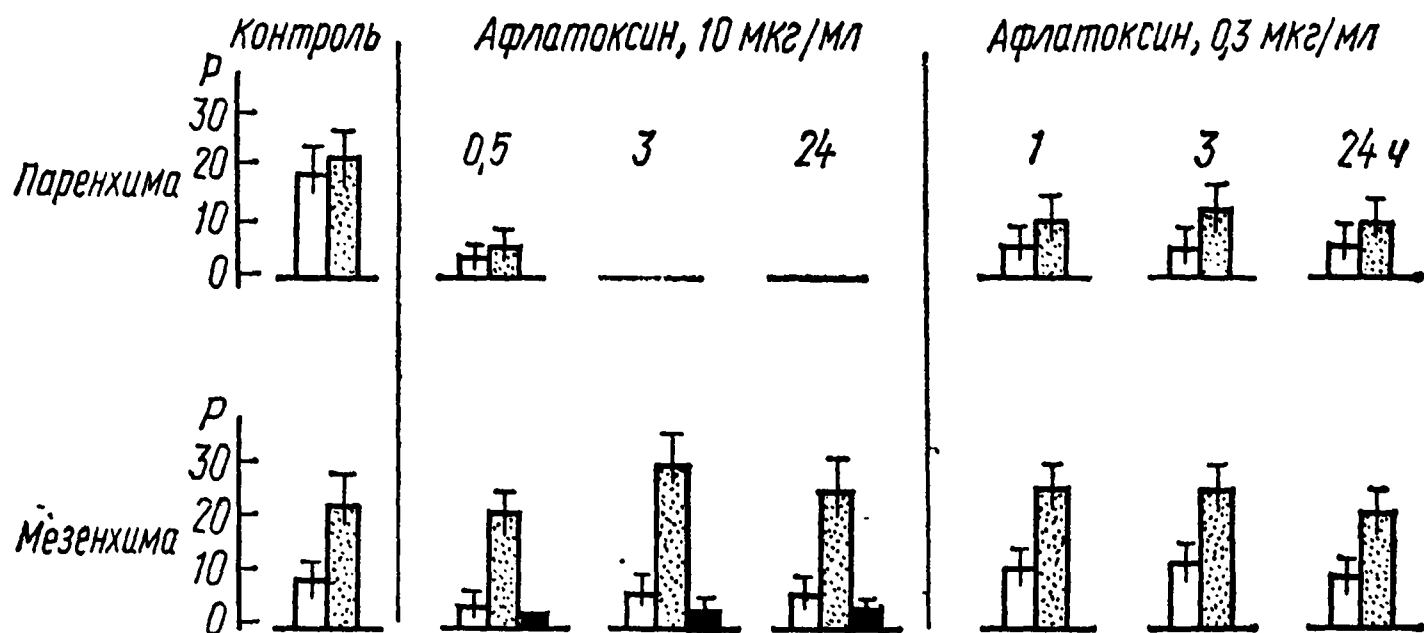


Рис. 110. Распределение радиоактивности (^3H -уридина) в ядрах (□), кариоплазме (▤) и цитоплазме (■) клеток паренхимы и мезенхимы печени куриного эмбриона 12-дневного возраста.

с панкреатином. Трипсинизацию проводят в колбах Эрленмейера с магнитной мешалкой, которую специально монтируют в систему перемешивания и слива клеточной взвеси. Трипсинизацию эмбриональных тканей проводят при 37°C в течение 2—3 ч многократной сменой растворов трипсина до исчезновения из среды взвешенных клеток. Жидкость со взвешенными клетками собирают, и клетки осаждают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 7—10 мин, затем ресуспендируют в питательной среде (37°C) в определенном количестве (подсчет производят в камере Горяева).

Получение культуры клеток печени куриного эмбриона. Из печени свежedisсектированных 12-дневных куриных эмбрионов готовят первичную культуру. После трипсинизации культивируют клетки печени при 37°C в бутылках на стекле.

1. К минимальной среде добавляют 5%-ный раствор коровьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и вводят неочищенный афлатоксин в концентрации 100, 50, 10, 1 мкг/мл. Клетки печени анализируют через 1, 3, 6, 12 и 24 ч. Контроль — культура без афлатоксина (или другого микотоксина). Клетки через указанные промежутки времени фиксируют смесью — уксусная кислота — этанол — формалин, окрашивают гематоксилином и районы ядер рассчитывают как круги или эллипсы. Измеряют 100 клеток паренхимы и 100 клеток мезенхимы. Ядра паренхимных клеток чувствительны — они разрушаются, мезенхимных — устойчивы, не отличаются от контроля.

2. Клетки обрабатывают афлатоксином в концентрации 10 или 0,3 мкг/мл в течение 30 мин; 3; 24 ч. За 30 мин до конца каждого срока

клетки экспонируют в растворе меченого ³H-уридина концентрацией 3 мкг/мл. Через 3 ч экспозиции в ядрах и кариоплазме клеток паренхимы не обнаруживаются зернышки серебра, а в клетках мезенхимы наблюдаются незначительные изменения против контроля через 24 ч экспозиции.

3. После инкубации с неочищенным афлатоксином (1 мкг/мл) через 5; 15; 30 мин растущие клетки трижды промывают балансированным раствором Ганка и затем 5 ч метят в растворе ³H-уридина или ³H-лейцина концентрацией 3 мкг/мл. Наступает дегенерация ядер, вызванная ингибацией в них синтеза РНК и затем белка (рис. 110).

Токсическое действие афлатоксинов на культуры клеток разных типов проявляется в характерных патоморфологических изменениях клеток, связанных с нарушением клеточного монослоя, изменением интенсивности митотического деления и нарушением функциональной активности клеток. Введение в культуру клеток 0,05 мкг/мл афлатоксина В₁ полностью подавляет рост клеток легкого эмбриона. ЛД₅₀ для клеток HeLa составляет 5—7 мкг/мл, клеток печени взрослого человека — 14,3 мкг/мл. Токсическое действие на клетки печени эмбриона человека оказывают также G₁, G₂, В₂ и другие микотоксины.

Х.3.2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА ЖИВОТНЫХ

Помимо перорального способа введения водных вытяжек из грибов и применения кожной пробы для определения токсических грибов существует подкожное и внутрибрюшинное введение экстрактов токсинов и культуральных жидкостей. Для этих целей используют мышей, крыс, морских свинок, кроликов. За животными ведут постоянное наблюдение в течение 10 дней. Отмечают общее состояние животных, их массу, изучают состав крови.

Т а б л и ц а 22. Пример расчета ЛД*₅₀ [300]

Доза, мл	Количество животных на дозу	Количество павших животных	<i>z</i>	<i>d</i>	<i>zd</i>
0,9	5	5	—	—	—
0,8	5	4	4,5	0,1	0,45
0,7	5	2	3,0	0,1	0,30
0,6	5	4	3,0	0,1	0,30
0,5	5	3	3,5	0,1	0,35
0,4	5	1	2,0	0,1	0,20
0,3	5	0	0,5	0,1	0,05

* (aM) = 0,9 → $\frac{1,65}{5} = 0,57$; $\Sigma (zd) = 1,65$.

Подкожное введение. Для подкожной инъекции используют водные вытяжки из грибов, культуральные жидкости, экстракты токсических веществ. Мышам вводят однократно по 0,5 —1 мл, морским свинкам одно- или двукратно — 2—3 мл, кроликам двукратно — 2—3 мл.

Внутрибрюшинное введение. Водные и спиртовые экстракты токсических веществ (7—9°) или культуральную жидкость, профильтрованную через фильтр Зейца, вводят по 0,5—1 мл внутрибрюшинно мышам, по 2—3 мл морским свинкам, по 5 мл кроликам.

Расчет летальной дозы токсических веществ. Для оценки переносимости и токсичности препарата определяют его максимально переносимую дозу (МПД), абсолютно смертельную дозу (ЛД₁₀₀) и дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (ЛД₅₀). Опыт начинают обычно с определения этих доз для белых мышей. Препарат вводят в разных дозах: от тех, которые не вызывают у животных явлений отравления, до вызывающих гибель всех подопытных мышей.

Т а б л и ц а 23. Пример расчета среднесмертельной дозы (X_{ср})

Доза, мг/кг	Количество под- опытных животных	Количество павших животных	Смерт- ность, %	Доза, мг/кг	Количество под- опытных животных	Количество павших животных	Смерт- ность, %
20	10	0	0	50	10	8	80
30	10	0	0	60	10	10	100
40	10	4	40	70	10	10	—

Расчет 1. (30+40) (40—0) = 2800.
2. (40+50) (80—40) = 3600.
3. (50+60) (100—80) = 2200.
Сумма = 2800+3600+2200=8600.
 $X_{ср} = \frac{8600}{200} = 43 \text{ (мг/кг)}$.

Каждую дозу вводят 5 или 10 мышам, обычно внутрибрюшинно. Учитывается количество животных, павших за все время наблюдения.

ЛД₅₀ рассчитывают методом Кербера $(aM) = D_m - \Sigma (zd)/m$, где (aM) — ЛД₅₀; D_m — доза, вызывающая гибель всех подопытных животных; z — половина числа животных, павших от двух последующих доз; d — разница объемов двух последующих доз; m — количество подопытных животных (табл. 22). Вместо ЛД₅₀ можно рассчитывать среднюю смертельную дозу (мг/кг) по Г. Н. Першину: $X_{ср} = (a + + b) (m - n)/200$, где $(a + + b)$ — сумма двух последовательных доз; $(m - n)$ — разность процента смертности от двух последующих доз; $X_{ср}$ — средняя смертельная доза (табл. 23) [300].

Х.3.3. ПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ МИКОТОКСИНОВ

Токсикоз, вызванный подкожным или внутрибрюшинным введением токсических веществ грибов, характеризуется угнетением состояния животного, снижением массы, развитием воспалений в месте инъекции. Резко токсичные штаммы грибов рода *Fusarium* вызывают гибель лабораторных животных на 1—4-е сут в зависимости от вида животного. Слабо токсичные штаммы вызывают заболевания с благоприятным исходом.

Подкожное или внутрибрюшинное введение токсинов *Stachybotrys alternans* и *D. toxicum* ведет к развитию нервных явлений — судорог, резкому возбуждению и гибели через 6—10 ч. Некоторые виды грибов рода *Aspergillus* могут вызывать гибель мышей через 4—6 ч, морских свинок через 1—2 сут, кроликов — через более продолжительное время. Токсины грибов рода *Penicillium* и *Pithomyces chartarum*

нарушают функции желудочно-кишечного тракта и печени. Интенсивность проявления токсикоза зависит от степени токсичности грибов [46, 299, 485, 502, 580, 659, 768, 770, 789].

Микотоксины условно делят на две группы: вызывающие поражение печени и почек и вызывающие поражение других органов.

Х.3.3.1. МИКОТОКСИНЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЕЧЕНИ ИЛИ ПОЧЕК В КАЧЕСТВЕ ПЕРВИЧНОГО ИЗМЕНЕНИЯ

Спородесмины вызывают поражение печени в форме острого воспаления желчных протоков, которое заканчивается их фиброзным перерождением, а также воспаление кожи лица, губ и других органов, не защищенных от солнечного света. Из лабораторных животных чувствительны морские свинки, кролики и крысы.

При скормливание 50—100 мкг спородесмина морским свинкам наблюдаются слабые и при введении 100—200 мкг сильные поражения печени. Животным вводят токсин в пищу в течение 7 дней; исследуют на 21-й день после начала дачи токсина. В зависимости от дозы и продолжительности кормления отмечают следующие патологоанатомические изменения: желчная эпителиальная гиперплазия; поражение внутридольных желчных протоков; поражение сосудов; фокальные коагулятивные некрозы паренхимы.

Охратоксины вызывают поражение почек, выражающееся в образовании некрозов тубулярных клеток, в печени наблюдаются гиалиновая дегенерация и жировое перерождение клеток паренхимы. Чувствительны кролики и утята.

Исландиотоксины вызывают поражение печени в форме центральнобулярных некрозов, жирового перерождения, циррозов, образования злокачественных опухолей (саркомы и карциномы). Чувствительны мыши и крысы.

Виридикатопенициллотоксины вызывают хроническое поражение почек, выражающееся в дегенерации тубулярных клеток, образовании соединительной ткани и цист. Клинически отмечается повышение потребления воды и выделения мочи. Из лабораторных животных чувствительны мыши и крысы.

Афлатоксины вызывают поражение печени в форме некрозов, пролиферации клеток эпителия желчных протоков, фиброзов и развития злокачественных опухолей (карциномы), торможения роста и усвоения пищи. Наиболее чувствительны 1—5-дневные утята, морские свинки, кролики.

Разработаны модели патологических изменений под воздействием афлатоксина у крыс и утят в зависимости от дозы. При скормливание утятам 60 мкг токсина в день (сублетальная доза) в течение 5 дней отмечается снижение содержания гликогена, повышение содержания липидов в печени; содержание общего белка не изменяется. Скармливание 600 мкг афлатоксина в течение такого времени снижает синтез белка, определяемый по интенсивности включения меченого лейцина в клетки печени. Доза 1,56 мкг вызывает депрессию роста и атрофию печени утенка. При дозах 2—31,25 мкг у утят наблюдается в разной степени выраженная пролиферация клеток эпителия желчных протоков. Доза токсина 15 мкг вызывает у утят интенсивную пролиферацию и жировое перерождение клеток паренхимы печени [55].

Х.3.3.2. МИКОТОКСИНЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ПОРАЖЕНИЕ ДРУГИХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

Стахиботриотоксины — наиболее характерным признаком в хронических опытах является лейкопения, агранулоцитоз, тромбопения и в связи с этим замедление или отсутствие ретракции кровяного сгустка, геморрагии и некрозы слизистых пищеварительного тракта, других тканей и паренхиматозных органов. Оказывают дермoneкротическое действие. В больших дозах вызывает остановку изолированного сердца лягушки в систоле и гемолиз эритроцитов. Наиболее чувствительны кролики, морские свинки, мыши, крысы.

Дендродохины вызывают нарушение кровообращения, переполнение кровеносных сосудов передней половины туловища, геморрагии тканей и паренхиматозных органов, отечность органов и тканей. При определенной концентрации токсина у крыс наблюдается бронхо- и бронхиолоэктазия, острый пневматоз альвеол, лимфопения. При внутрибрюшинном введении токсина чувствительны кролики, мыши, морские свинки, крысы [366].

Споротрихеллофузариотоксины — наиболее характерным признаком является лейкопения, как и при стахиботриотоксикозе, число лейкоцитов снижается до 100 и менее в 1 мм^3 крови, возникают точечные или пятнистые кровоизлияния, некротические очаги в тканях и органах. Вызывают также остановку изолированного сердца лягушки в систоле. Оказывают дермoneкротическое действие. Гемолиз в определенных концентрациях не снимается добавлением холестерина. Чувствительны голуби, мыши, кролики, крысы, домашняя птица.

Цитреовиридин вызывает поражение двигательных центров спинного и продолговатого мозга с прогрессивным параличом движения и дыхания. Поражается сердце. Чувствительны крысы, морские свинки, собаки и др.

Зеараленоны вызывают эстрогенный синдром, проявляющийся в увеличении матки, набрякании влагалища у самок, увеличении грудных желез у молодых животных обоих полов, прекращении беременности животных. Чувствительны крысы, свиньи.

Эрготоксины вызывают цианоз, конвульсивная форма сопровождается судорогами, гангренозная — омертвением конечностей. Вызывают резкое сокращение мускулатуры матки, особенно в период беременности, гиалиновое перерождение стенок сосудов головного мозга, образование гиалиновых тромбов.

Х.3.4. БИОХИМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МИКОТОКСИНОВ

Микотоксины влияют на процессы обмена, активность ферментов и регуляторные механизмы животных. Они ингибируют синтез РНК и ДНК, оказывают влияние на содержание гликогена в печени, витаминов в тканях и органах, изменяют соотношение белков и других компонентов в сыворотке крови и т. д. Ниже приведены методы изучения биохимических свойств отдельных микотоксинов [299].

Х.3.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ НИВАЛЕНОЛОМ

Самцам белых мышей чистой линии вводят внутрибрюшинно токсин (40 мкг на 10 г живой массы) и за 1 ч перед вскрытием таким же способом вводят 1 Ки/10 мкг ^{14}C -лейцина (25 мКи/ммоль). Ткани быст-

ро помещают в порошок сухого льда, гомогенизируют на холоду, добавляют 10% перхлоруксусной кислоты, белок фракционируют и определяют уровень радиоактивности [820].

Х.3.4.2. ИНГИБИЦИЯ СИНТЕЗА МАКРОМОЛЕКУЛ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Асцитные клетки опухоли Эрлиха поддерживают внутри брюшины самцов белых мышей чистой линии, затем клетки собирают из брюшной полости, промывают холодным 0,9%-ным раствором NaCl, смешивают с равным объемом солевого раствора. Для испытания берут 0,2 мл суспензии, добавляют 0,6 мл раствора Локка — Рингера и инкубируют 15 мин при 37° С в присутствии или отсутствии токсина. Затем в каждую реакцию смесь последовательно добавляют 0,1 Ки ^{14}C -лейцина, 2 Ки ^{14}C -урацила (21 мКи/ммоль) или 2 Ки ^{14}C -тимидина (50 мКи/ммоль), доводя объем раствора до 1 мл. Инкубируют еще 40 мин и добавляют равный объем холодной 10%-ной хлоруксусной кислоты. Кислотонерастворимый осадок фракционируют для выделения белков, РНК и ДНК (по принятым методикам). Определяют радиоактивность фракций [820].

Х.3.4.3. ИНГИБИЦИЯ ГЛИКОЛИЗА В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ

Клетки суспендируют в растворе Локка — Рингера, инкубируют в пробирках Тунберга с токсином и без токсина при 37° С 40 мин. Содержание молочной кислоты в реакционной смеси определяют по принятому методу [820].

Х.3.4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА ТОКСИНАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕТИКУЛОЦИТОВ КРОЛИКА

Кролику подкожно вводят 1,2%-ный раствор фенилгидразина из расчета 5 мг на 1 кг живой массы ежедневно в течение 4 дней. На 7-й день берут кровь из сердца, центрифугируют ее в течение 5 мин при 2000 об/мин. Осадок, состоящий почти на 85% из ретикулоцитов, промывают двумя объемами раствора Локка—Рингера на льду. Суспензию клеток сохраняют на холоду.

Для испытания действия токсина, в данном случае ниваленола, 0,1 мл суспензии клеток ретикулоцитов, 0,3 мл раствора Локка—Рингера, 0,05 мл раствора токсина инкубируют 15 мин при 37° С, затем вводят 0,05 мл (0,05 С) L- ^{14}C -лейцина в реакционную смесь и инкубируют еще 40 мин. Реакцию останавливают добавлением 0,5 мл 10%-ной перхлорной кислоты, фильтруют раствор через фильтровальную бумагу, промывают 5%-ной перхлорной кислотой и смесью этанол—эфир (3 : 1 по объему). Определяют радиоактивность в клетках. Точность метода, определяемая степенью ингибиции включения L- ^{14}C -лейцина в белок, достигает 0,5 мкг. Метод может быть применен при изучении цитологических изменений в клетке под влиянием токсинов. Отмечено соответствие между токсичностью для мышей и уровнем ингибиции включения L- ^{14}C -лейцина в белок [821].

Х.3.4.5. ДЕЙСТВИЕ АФЛАТОКСИНОВ НА МЕМБРАНЫ ЛИЗОСОМ

Нарушение синтеза ДНК и РНК, как следствие взаимодействия афлатоксина В₁ с молекулой ДНК, является наиболее рано выявляемым биохимическим эффектом афлатоксинов, сопровождаемым сни-

жением активности РНК-полимеразы, общего и микросомального белка в печени обезьян, угнетением синтеза липидов. Обнаружено прямое действие афлатоксинов на структуру и функции митохондрий и рибосомальный аппарат клетки, выявлено ингибирующее влияние на процессы гидроксилирования в микросомах печени и снижение активности маркерного фермента микросом — глюкозо-6-фосфатазы [363, 789]. Несмотря на многочисленные исследования, биохимические механизмы действия большинства микотоксинов до настоящего времени недостаточно выяснены. При интоксикации чувствительных к спорофузарину животных выявлена значительная избирательная инактивация комплекса лизосомальных ферментов печени и повышение неседиментационной активности кислых гидролаз, свидетельствующих о нарушении стабильности мембран лизосом.

Спорофузарин оказывает резкое дестабилизирующее действие на мембраны лизосом печени и селезенки крыс, не влияя существенно на стабильность мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума, что находится в соответствии с локализацией патологического процесса при отравлении [434].

Х.3.5. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ

Химические методы определения токсичности культур грибов весьма разнообразны. Большинство методов разработано для культур грибов рода фузариум и стахиботрис. Для анализа используют экстракты грибов.

Резорциновая проба. К определенному объему (1—5 мл) эфирного раствора стахиботриотоксинов или фузариотоксинов добавляют 0,5—2,5 мл концентрированной соляной кислоты и несколько кристалликов резорцина. Соляная кислота в присутствии токсина окрашивается в интенсивный красный цвет, через 24—48 ч выпадает осадок красного цвета. Аналогичная реакция происходит с фецином, пироксилексимом, гидрохиноном.

Реакция с концентрированным раствором аммиака. К определенному объему (1 мл) раствора токсина в серном эфире добавляют 5—7 мл 96%-ного этанола, осторожно подогревают и добавляют 5—7 мл 25%-ного водного раствора аммиака. Кипятят 5—10 мин. Сначала появляется интенсивная черно-фиолетовая окраска, затем выпадает осадок черного цвета.

Реакция с концентрированной соляной кислотой. Разработана для грибов рода фузариум. К 1 мл экстракта приливают 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. При наличии токсических веществ раствор окрашивается в красный или вишневый цвет.

Реакция Либермана — Бурхарда. Предложена для гриба стахиботрис и некоторых компонентов спорофузарина. 2—3 мл экстракта выпаривают и вновь растворяют осадок в хлороформе. К раствору добавляют несколько капель уксусного ангидрида. На полученный раствор осторожно по стенке наслаивают концентрированную серную кислоту. На границе раздела жидкостей, при наличии токсических веществ, появляется кольцо зеленого цвета, который изменяется в фиолетовый, а затем бурый.

Проба с ТХУ. Для анализа используют эфирные или спиртово-эфирные экстракты. К 1—2 каплям экстракта, помещенным в фарфоровую чашечку, прибавляют 5—8 капель 90%-ного раствора ТХУ и тщательно перемешивают. При наличии фузариотоксинов экстракт

приобретает различные оттенки зеленого цвета, дендродохинов — синего, стахиботриотоксинов — желтого и коричневого.

Химические методы определения токсичности не всегда совпадают с биологическими и не являются строго специфическими.

Х.3.6. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ

В основе многочисленных методов обнаружения, идентификации и количественного учета микотоксинов лежат хроматографические методы. С помощью этих методов изучены многочисленные токсические метаболиты грибов. Наибольшее распространение получил метод сборной бумажной и тонкослойной хроматографии. В целом все известные методы, несмотря на их различия, сводятся к нескольким общим приемам. Это прежде всего экстрагирование микотоксина, собственно хроматографическое разделение токсических веществ, хроматографическое разделение микотоксинов в присутствии вещества-свидетеля и определение количества вещества после элюции с хроматограммы спектрофотометрическим методом.

Х.3.6.1. БИОАВТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕНДРОДОХИНА МЕТОДОМ СБОРНОЙ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Культуральную жидкость или концентрированные растворы неочищенной смеси дендродохинов наносят на полоски хроматографической бумаги, один конец которой закрепляют у пробки пробирок ($3 \times 30,3 \times 60$ мм), а другой с нанесенным токсином опускают в растворитель, не погружая линию старта. В качестве растворителей используют эфир, петролейный эфир, хлороформ, воду, кислоты, щелочи и т. д. (хроматография восходящая или восходяще-нисходящая). После продвижения растворителя полоски бумаги вынимают, просушивают, разрезают на части и проявляют биоавтографически: полоски хроматограмм помещают на газон тест-культуры *Candida stellatoidea* 62 или *Saccharomyces vini* «ф» на сусловом агаре в чашки Петри. Значение R_f определяют по расположению зоны ингибиции роста тест-культуры.

Х.3.6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ И ДРУГИХ МИКОТОКСИНОВ МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ И КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Метод определения афлатоксинов основан на извлечении их из исследуемой пробы органическими растворителями, очистке экстрактов и идентификации афлатоксинов на тонкослойных хроматографических пластинках (ТСХ-пластинки) по флюоресценции в ультрафиолетовом свете (УФ). Метод состоит из двух этапов — качественного (экспрессного) и полуколичественного определений [294].

Экспрессный вариант включает экстракцию афлатоксинов из пробы (50 г) смесью воды с хлороформом, фильтрацию и обезвоживание экстракта, его концентрацию, трехкратную очистку в тонком слое силикагеля диэтиловым эфиром, разделение на той же пластинке в системе растворителей ацетон—хлороформ (1 : 9) и идентификацию по флюоресценции в УФ-свете с длиной волны 363—366 нм (R_f афлатоксина B_1 — 0,45—0,5, афлатоксина B_2 — 0,4—0,45, свечение голубовато-синее). Продолжительность одного анализа составляет 1—1,5 ч. Чувствительность определения — 0,8—1 мкг/пробу (16—20 мкг/кг).

Полуколичественное определение включает обезжиривание пробы (20 г) петролейным эфиром или гексаном в аппарате Сокслета, экстракцию афлатоксинов из обезжиренной пробы метанолом, переэкстракцию в хлороформе, разделение экстракта на ТСХ-пластинках с силикагелем в системе метанол—хлороформ (5 : 95) или ацетон—хлороформ (1 : 9) и индентификацию по флюоресценции в УФ-свете (365 нм). Метод позволяет установить минимальные количества афлатоксинов, дающие

Т а б л и ц а 24. Определение концентрации афлатоксина [294]

Номер пробы на ТСХ-пластинке	Концентрация афлатоксина В ₁ в исследуемом образце продукта, мкг/кг	Степень токсичности
1	Более 1000	Очень токсичный
2	250—1000	Токсичный
3	50—250	Слабо токсичный
4	5—50 *	Нетоксичный

* Отсутствие флюоресценции позволяет считать, что исследуемый образец практически не содержит афлатоксинов.

на ТСХ-пластинке визуальную отмечаемую флюоресценцию (0,4 нг афлатоксина В₁ и 0,3 нг афлатоксина G₁), и определить их концентрацию в пробе по таблице или по формуле. Время одного анализа составляет 10—12 ч. Чувствительность определения —0,5 мкг/пробу (25 мкг/кг).

Иногда наряду с афлатоксинами В₁ и В₂ могут встречаться афлатоксины G₁ и G₂ с характерным желто-зеленым свечением в УФ-лучах (R_f — в пределах 0,3—0,35). На практике эти фракции встречаются редко, причем обычно при наличии афлатоксинов В. Определение концентрации афлатоксина в пробе при наличии флюоресцирующих пятен проводят по табл. 24.

После хроматографирования ряда увеличивающихся по объему проб одного разведения (например, 5, 10, 15 и 20 мкл раствора В) отмечают пробу с минимальным объемом, в которой заметна флюоресценция, и рассчитывают концентрацию афлатоксина В₁ в исследуемом продукте по формуле $C = \frac{400 \cdot D}{W \cdot V}$ (мкг/кг), где D — объем, до которого доведен исходный экстракт (мл); W — навеска исследуемого продукта (г); V — минимальный объем пробы на пластинке, дающий визуальную отмечаемую флюоресценцию (мкл).

Пр и м е р. Из 20 г муки получено 100 мл экстракта, 25 мл которого развели до 100 мл. Из полученного раствора на хроматограмму нанесли 5, 10, 15, 20 и 25 мкл. Флюоресценция отмечена в пробах 25, 20 и 15 мкл, но отсутствует в пробах 10 и 5 мкл. В этом случае $D = \frac{100 \cdot 100}{25} = 400$ мл; $W = 20$ г; $V = 15$ мкл; $C = \frac{400 \cdot 400}{20 \cdot 15} = 534$ мкг/кг.

Подобный расчет при условии нанесения на хроматограмму серии проб одного разведения, объем которых возрастает в арифметической прогрессии (1, 2, 3, 4, мкл и т. д.), позволяет определять содержание афлатоксина в образце с точностью до нескольких микрограммов.

Х.3.6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ В ПОРАЖЕННЫХ СУБСТРАТАХ [597]

На первом этапе обезжиривают субстрат смесью гексан — метанол — вода (1 : 1 : 1) и отделяют водно-метаноловый слой. К водно-метаноловому слою добавляют промытый кислотой целит 545, наполняют смесью хроматографическую колонку; промывают гексаном, затем смесью гексан — хлороформ (1 : 1). Элюат гексан — хлороформ со-

держит афлатоксины. Растворитель удаляют выпариванием досуха и добавляют определенный объем хлороформа. Раствор хроматографируют на тонком слое силикагеля и разделяют смесью хлороформ—метанол (93 : 7). По степени и качеству флюоресценции в УФ-лучах и сравнению значений R_f с известными образцами определяют наличие афлатоксинов в исследуемом продукте. Количество афлатоксина (мкг/кг) определяют по формуле $S_1 = SyXV/XW$, где S — количество стандартного раствора афлатоксина B_1 , соответствующее неизвестному (мкл); y — концентрация стандартного раствора афлатоксина B_1 (мкг/мл); V — объем конечного разведения экстрагированного образца (мкл); X — количество экстрагированного образца, дающего флюоресценцию, аналогичную стандартному раствору B_1 (мкл); W — масса образца (г), использованного для экстракции в колонке целита.

Для хроматографии в тонком слое в качестве растворителей используют также ацетон — хлороформ (1 : 9), прямое экстрагирование хлороформ из водных растворов образца и др.

Х.3.6.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ И КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Неочищенный препарат афлатоксинов хроматографируют на пластинках тонкого слоя (до 3 мм) окиси алюминия, содержащего 15% сульфата кальция, или на силикагеле, содержащем около 13% суль-

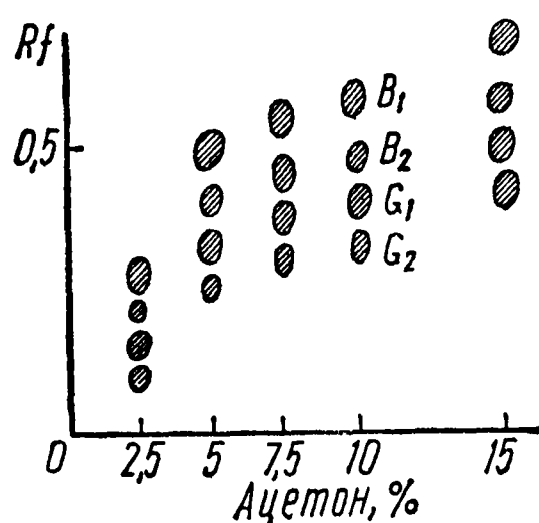
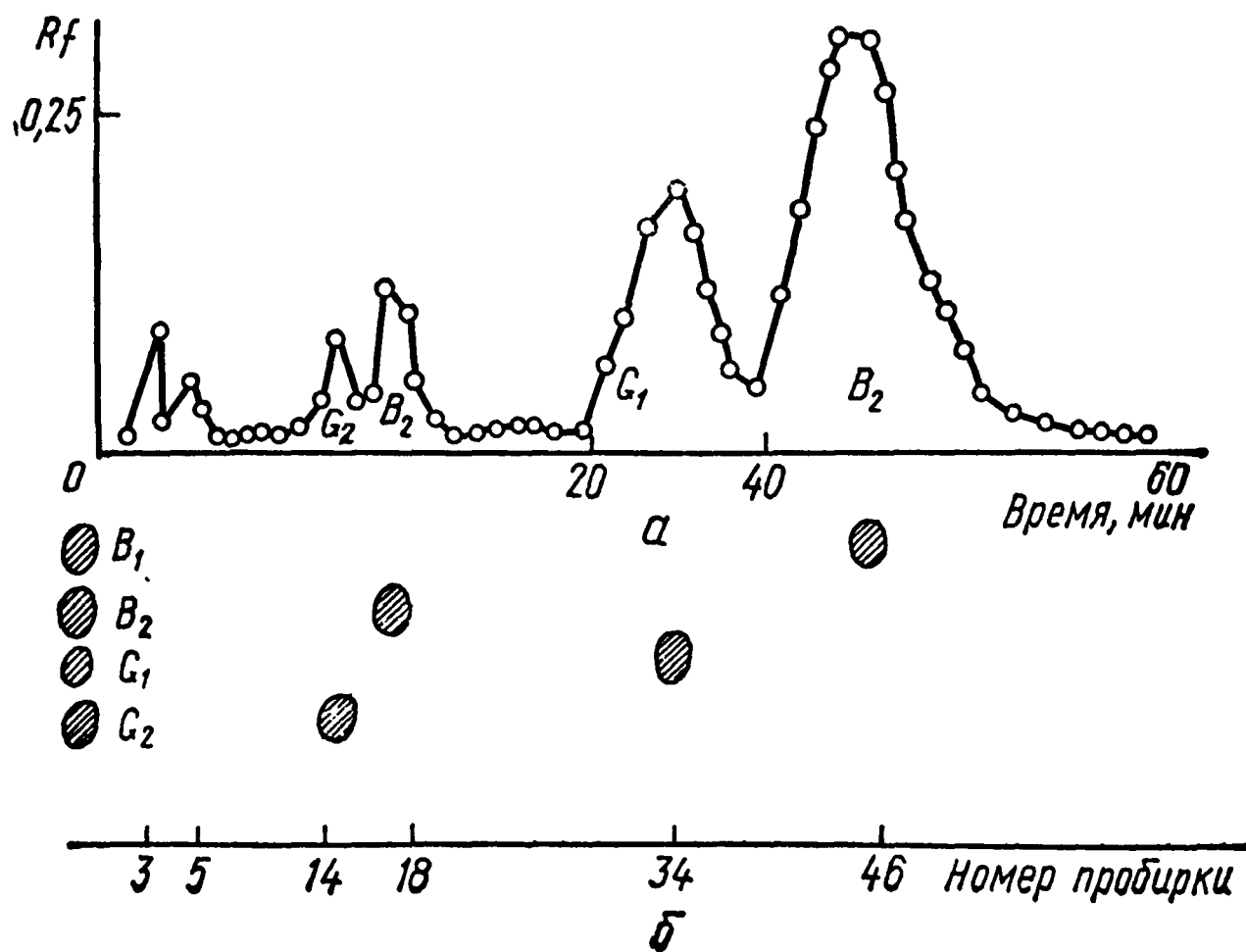


Рис. 111. Тонкослойная хроматограмма смеси афлатоксинов (адсорбент — силикагель, растворители — ацетон, хлороформ).

Рис. 112. Тонкослойная и колоночная хроматограммы смеси афлатоксинов:

а — фракционирование смеси афлатоксинов на колонке (8×500 мм; сефадекс-10; элюат — 1%-ный раствор метанола); б — хроматографическое разделение смеси афлатоксинов в тонком слое силикагеля.



фата кальция (силикагель *g*). Растворители — хлороформ, метанол, этанол, ацетон, гексан, этилацетат, бутанол или смеси любого из двух этих растворителей. Хроматография восходящая. Наиболее успешное разделение по значению *R_f* наблюдается на тонком слое силикагеля *g*, когда в качестве растворителя используют ацетон (от 5—10%) в хлороформе.

При колоночной хроматографии применяются колонки 8 × 500; 10 × 300, 15 × 300 мм, которые заполняют соответственно процедуре силикагелем, сефадексами *g*-10, *g*-25 или *gLH* (Merk), окисью алюминия. Элюенты — хлороформ, метанол, этанол, ацетон, вода и др. Количество токсина определяют по оптической плотности раствора при длине волны УФ-лучей 365 нм на спектрофотометре. Наилучшие результаты получены при хроматографировании на колонке сефадекса *g*-10 и элюировании 1%-ным раствором метанола (рис. 111, 112).

Х.3.6.5. РАЗДЕЛЕНИЕ ДЕНДРОДОХИНОВ КОЛОНОЧНОЙ И ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Концентрированный раствор неочищенной смеси токсинов в хлороформе помещают на заполненную мокрым способом колонку окиси алюминия 18 × 180 мм (активность не ниже 2-й степени). Затем последовательно промывают петролейным эфиром, хлороформом, 5%-ным метанолом в хлороформе, метанолом. Фракция петролейного эфира — содержит липиды, хлороформа — дендродохины *D*₁, *D*₂, *D*₃; 5%-ного метанола в хлороформе — дендродохины *D*₂, *D*₄, *D*₅, метанола — сахара. Повторно хроматографируют концентрированные растворы полученных фракций. Разделение контролируют хроматографически на тонком слое алюминия, растворитель — петролейный эфир — хлороформ — метанол (10 : 5 : 1). Проявляют в парах йода в эксикаторе [299].

Х.3.6.6. ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕСКОЛЬКИХ МИКОТОКСИНОВ [274]

Метод одновременного определения афлатоксинов *B*₁, *B*₂, *G*₁, *G*₂, охратоксина *A*, зеараленона, стеригматоцистина и патулина на пластинках «Силуфол» является модификацией метода Столоффа.

Экстракция. 50 г измельченного зерна, проходящего через сито с диаметром ячеек 0,8 мм, экстрагируют 20 мин на качалке смесью 80 мл ацетонитрила и 20 мл 4%-ного раствора *KCl*, фильтруют через двойной бумажный фильтр и 100 мл фильтрата переносят в делительную воронку объемом 250 мл.

Очистка экстракта. В делительной воронке экстракт дважды обезжиривают изookтаном (по 50 мл). Ацетонитрильный слой упаривают в роторном испарителе при 40—45° С. Остаток перерастворяют в 20 мл ацетонитрила. Для лучшей очистки экстракта загрязняющие примеси осаждают уксуснокислым свинцом. С этой целью к экстракту, растворенному в ацетонитриле, добавляют 60 мл воды и 20 мл 20%-ного уксусного свинца, энергично встряхивают смесь и оставляют на 1—2 мин для образования осадка, после чего добавляют 5 г целита 545. Экстракт перемешивают и фильтруют. 50 мл фильтрата переносят в делительную воронку и трижды промывают хлороформом (50; 20 и 20 мл). Хлороформ объединяют и упаривают, сухой остаток растворяют в 200 мкл смеси бензол — ацетонитрил (98 : 2 по объему) (экстракт *A*). В случае высоких концентраций микотоксинов экстракт *A* разбавляют еще в 5 раз (экстракт *B*). В качестве основной системы для определения

охратоксина А, зеараленона, стеригматоцистина, пеницилловой кислоты и цитринина используют систему ТЭМ—толуол — этилацетат— муравьиная кислота (6 : 3 : 1 по объему). Поскольку в этой системе не всегда удается добиться разделения афлатоксинов В₂ и G₁, при определении последних применяют систему БМУ — бензол — метанол — уксусная кислота (24 : 2 : 1 по объему). В случае присутствия в экстракте одного охратоксина А дополнительной системой может служить хлороформ—этанол (95 : 5 по объему), в которой афлатоксины имеют большие значения R_f, чем охратоксины, и последние идут в области, относительно свободной от загрязнений.

Для разделения цитринина и охратоксина А при их одновременном присутствии можно рекомендовать следующие системы: диэтиловый эфир—метанол—вода—муравьиная кислота (95 : 4 : 1 : 1) и ацетон—хлороформ — вода (12 : 88 : 1,5). При определении патулина методом двухмерной хроматографии применяют пластинки «Силуфол UV-254».

Условия хроматографирования. На хроматографическую бумагу наносят микрошприцем на 10 мкл 2; 4; 6; 8 и 10 мкл исходного раствора А, а также шесть пятен со стандартными растворами микотоксинов (по 5 мкл каждого) и разгоняют в системах указанных выше растворителей. Хроматограммы просматривают под источником УФ-лучей с длиной волны 365 нм (МИГ-1) и выбирают пятно экстракта, по величине и интенсивности флюоресценции визуально совпадающее со стандартом токсина. На основании полученных данных вычисляют содержание микотоксина (мкг/кг) : $M = 200 \cdot 4 \cdot 1000 \cdot n / 50 \cdot V$, где n — содержание микотоксина в пятне стандарта (мкг); V — объем пятна экстракта А, равного по флюоресценции стандарту (мкл); 50 — навеска зерна (г); 200 — конечный объем экстракта (мкл); 4 — коэффициент, учитывающий использованный объем экстракта; 1000 — для пересчета содержания токсинов на 1 кг зерна. При использовании экстракта Б в числитель вводят коэффициент 5.

Х.3.6.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭПОКСИТРИХОТЕЦЕНА Т-2 [151]

Токсические вещества экстрагируют в течение суток, расходуя 150 мл ацетона на 50 г субстрата. Водную фазу, полученную после удаления ацетона, разбавляют в 2 раза водой, и токсин экстрагируют смесью гексана и диэтилового эфира (1 : 1; 2 раза по 1 л). Остаток после выпаривания экстракта смешивают с 40 мл смеси хлороформа и гексана (1 : 1). По 20 мл смеси вносят в колонку с 30 г активированного силикагеля АСК (40—60 меш). Каждую колонку промывают 200 мл гексана. Затем пропускают смесь хлороформа и гексана, собирая в фарфоровые чашки фракции по 250 мл, которые выпаривают. 2—4 фракции объединяют по максимальному содержанию компонента при газохроматографическом анализе с электронно-захватным детектором, а остаток вносят в колонку с 15 г активированного силикагеля КСК (150—200 меш). Токсин элюируют смесью гексана и диэтилового эфира, собирая фракции по 20 мл (40 фракций). Кристаллы белоснежного вещества, выделившегося в пробирках из 10—30 фракций после удаления эфира, объединяют. Продукт перекристаллизовывают из смеси гексана и эфира, высушивают над безводным хлористым кальцием и подвергают анализу различными физико-химическими методами. Сравнение ИК- и масс-спектров полученного вещества со спектрами уже известных трихотеценов позволяет установить его принадлежность к микотоксину Т-2, который был выделен из *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichiella* var. *tricinctum*.

Х.3.6.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗЕАРАЛЕНОНА [232]

Микотоксин экстрагируют из субстрата ацетоном. Маслянистый коричневый остаток в чашке реэкстрагируют в 1 л диэтилового эфира, который обезвоживают, пропуская через слой (3 см) безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха. Полученное после выпаривания эфира масло растворяют в 20 мл эфира и смешивают с 20 г силикагеля АСК. Эфир удаляют под струей воздуха, а силикагель с маслом вносят в верхнюю часть колонки, содержащей 100 г адсорбента, очищенного 100 мл гексана. Затем через колонку пропускают 900 мл гексана, который отбрасывают. Токсин F-2 элюируют из колонки смесью гексана и диэтилового эфира (2 : 1 по объему), собирая фракции объемом 60 мл (30 фракций).

Полученное вещество имеет температуру плавления 164° С и хроматографически однородно. В тонком слое силикагеля на пластинках силуфол в системе толуол — этилацетат — 85%-ная муравьиная кислота R_f полученного токсина равно 0,53. При нанесении 50 мкг вещества на пластинки получают только одно пятно, которое при облучении УФ-светом флюоресцирует голубовато-зеленоватым цветом, а при обработке серной кислотой и прокаливании приобретает коричневый оттенок. Чувствительность определения токсина посредством ТСХ и выявления под УФ-светом с максимумом 360 нм приближается к 0,02—0,05 мкг. Выделенный микотоксин соответствует зеараленону (F-2-лактон-6-10-окси-6-оксотранс-1-ундеценил-резорциновой кислоты).

Х.3.6.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОХРАТОКСИНОВ

Пораженный субстрат экстрагируют смесью хлороформ — метанол (95 : 5) в аппарате Сокслета, затем водным раствором бикарбоната натрия, отделяют водный слой и подкисляют его. Хроматографируют в тонком слое силикагеля и проявляют в растворе бензол — уксусная кислота (3 : 1). Пятна охратоксина А в УФ-лучах имеют зеленое свечение, R_f составляет 0,5, охратоксины В и С флюоресцируют голубовато-зеленым цветом и имеют соответственно R_f 0,35 и 0,65.

Пораженный субстрат экстрагируют метанолом, насыщенным водой, и *n*-гексаном, затем разделяют на целитовой колонке. Хроматографируют на тонком слое силикагеля. Интенсивность свечения пятен определяют по сравнению со стандартом. Чувствительность метода — 25 мкг токсина в 1 кг субстрата.

Х.3.7. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Спектрофотометрический метод анализа широко применяют для установления связи между спектрами поглощения различных веществ и их химическим строением и составом. Для количественного определения различных веществ используют или непосредственное поглощение света раствором определяемого вещества или определяемый компонент переводят с помощью химических реакций в соединения, имеющие характерный спектр поглощения. Для получения спектра поглощения, т. е. кривой светопоглощения, построенной в координатах $D = f(\lambda)$ или $\varepsilon = f(\lambda)$, проводят серию измерений оптической плотности растворов или молярного коэффициента светопоглощения при разных длинах волн в интересующей области спектра. Измерения проводят через 10—20 нм, а найдя границу максимума, промеряют эту область через

1—2 нм. По полученным данным строят кривую. В соответствии с природой светопоглощения и возможностями оптических приборов поглощение света измеряют в видимой (400—700 нм), ультрафиолетовой (185—400 нм) и инфракрасной (760—1 мм) областях спектра. Кривые светопоглощения обычно снимают с помощью спектрофотометров [31, 77, 313].

Спектрофотометры типа СФ-4 позволяют работать не только с окрашенными растворами, которые поглощают свет в видимой области спектра, но и с «бесцветными» для глаза растворами, которые поглощают свет в УФ или ближайшей ИК областях спектра: СФ-4, СФ-4а, СФД-2 — 760 — 1100 нм; СФ-8, СФ-9 — 760 — 2500 нм. Спектрофотометрический метод применяется наряду с элементным анализом для идентификации микотоксинов (см. раздел XIII.4.).

ХІ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОИДОВ

Микроорганизмы являются признанными продуцентами алкалоидов — производных индола. В последние годы обнаружено, что в культурах бактерий, актиномицетов, микроскопических грибов накапливаются вещества, относящиеся по ряду признаков к алкалоидам [22, 585].

ХІ.1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Предварительные опыты по отбору продуцентов рекомендуется проводить на средах следующего состава (г):

1. 50,0 маннита; 5,4 янтарной кислоты; 0,3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 K_2HPO_4 ; до 1 л водопроводной воды; раствор подщелачивают NH_4OH до pH 5,2; соли вносят после подщелачивания.

2. 20,0 глюкозы; 2,0 кукурузного экстракта; 2,0 пептона; 2,0 K_2HPO_4 ; 0,2 дрожжевого экстракта (порошок); 2,0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; до 1 л дистиллированной воды.

Погруженное культивирование проводят в колбах объемом 750 мл, содержащих 150 мл среды, на качалках при 200—260 об/мин. Для поверхностного культивирования используют матрасы емкостью 1,5 л с 200 мл среды, в состав которой входит маннит (среда 1). Использовать вертикальные качалки с гнездами для пробирок, применяемые для отбора продуцентов антибиотиков, не рекомендуется из-за небольшого объема анализируемого материала и низкой чувствительности некоторых методов идентификации алкалоидов, а также в связи с тем, что при продолжительном выращивании происходит значительное уменьшение объема среды вследствие испарения.

Температура термостатной комнаты $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Погруженное культивирование при посеве с исходной среды рекомендуется производить не более 20, поверхностное — не более 60 сут. При дальнейшей работе с конкретным продуцентом сроки культивирования, особенно при погруженном методе, удастся значительно сократить, меняя режимы выращивания и способ подготовки посевного материала. Колбы и матрасы засевают 10-суточной культурой, выращенной на скошенном сусло-агаре.

ХІ.2. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АЛКАЛОИДОВ

Для качественного анализа содержания алкалоидов используют фильтрат культуральной жидкости или мицелия. При первичной оценке микроскопических грибов в качестве продуцентов алкалоидов рекомендуется исследовать одновременно фильтрат и мицелий.

Последовательность определения. Отфильтрованный мицелий растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком, объединяют гомогенат с фильтратом и доводят рН смеси концентрированным аммиаком до 7,5—8,0. При использовании аммиака редко образуются стойкие эмульсии при последующей экстракции. Подготовленный таким образом фильтрат культуральной жидкости, объединенный с гомогенатом мицелия, экстрагируют 3—5 мин в делительной воронке равным объемом смеси хлороформ — изобутанол (4 : 1). Алкалоиды извлекают из слоя, содержащего органические растворители, после его фильтрации для удаления механических примесей 1%-ным раствором серной кислоты при соотношении объемов (изобутанол—хлороформ) — (серная кислота) 5 : 1. Кислую водную фазу (первый экстракт), содержащую алкалоиды, подщелачивают концентрированным аммиаком до рН 7,5—8,0, вновь экстрагируют смесью хлороформа и изобутанола в том же соотношении и переводят алкалоиды в водную фазу добавлением 1%-ного раствора серной кислоты, как описано выше. Полученный таким образом второй водный «кислый» экстракт исследуют на содержание алкалоидов. Применение хлороформа обусловлено тем, что по полноте извлечения известных алкалоидов он занимает одно из первых мест среди органических растворителей. Сочетание хлороформа с изопропанолом приводит к депротеинизации водных растворов. Белок, находящийся в большом количестве в гомогенате мицелия и фильтрате культуральной жидкости, искажает результаты качественных реакций осадков на алкалоиды.

Для анализов методом тонкослойной хроматографии можно рекомендовать несколько иной способ подготовки пробы [30]. Отфильтрованный, многократно промытый дистиллированной водой мицелий растирают с кварцевым песком до гомогенного состояния и экстрагируют смесью хлороформ — метанол (1 : 1 по объему) и дважды хлороформом. Объединенный хлороформ — метанольный экстракт подщелачивают 25%-ным раствором аммиака до рН 8,0 и вновь экстрагируют 3 раза хлороформом. Полученный таким образом экстракт сушат над безводным сульфатом натрия и удаляют растворитель в вакууме при 30—40° С, затем экстракт вновь растворяют в хлороформе. Образец готов для исследования методом тонкослойной хроматографии.

ХІ.3. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АЛКАЛОИДЫ

Положительная качественная реакция, строго говоря, является лишь признаком того, что исследуемый раствор может содержать алкалоид, но не служит абсолютным доказательством его присутствия. Однако из-за различной химической природы алкалоидов и разной физиологической активности *in vivo* этап качественного осаждения неизбежен. Исключение возможно лишь при поиске алкалоида (алкалоидов) известной химической природы или производного какого-либо соединения, для определения которого существует надежная качественная

проба. Например, производные индола при первичном отборе могут быть идентифицированы с помощью раствора *n*-диметиламинобензальдегида, дающего с ними характерную цветную реакцию.

Групповые осадительные реактивы готовят таким же образом, как и при анализе растительного сырья на содержание алкалоидов. Рекомендуется применять реактивы Вагнера, Майера, Зонненшейна и раствор кремневольфрамовой кислоты [305], реактивы Драгендорфа, Шайблера [473], образующие комплексы с алкалоидами. О наличии алкалоидов судят по появлению осадков. Названные реактивы имеют следующие пределы чувствительности по отношению к известным алкалоидам (мкг/мл): реактив Майера 2,5—10 000; Зонненшейна 1—2000; Вагнера 5—1400; Драгендорфа 3—250; Шайблера 1—1000; раствор кремневольфрамовой кислоты 2—1000 [473]. По степени чувствительности к алкалоидам грибов реактивы можно расположить в ряд: реактив Зонненшейна, реактивы Вагнера и Драгендорфа. Для большей убедительности рекомендуется ставить с одной и той же пробой не менее четырех различных реакций.

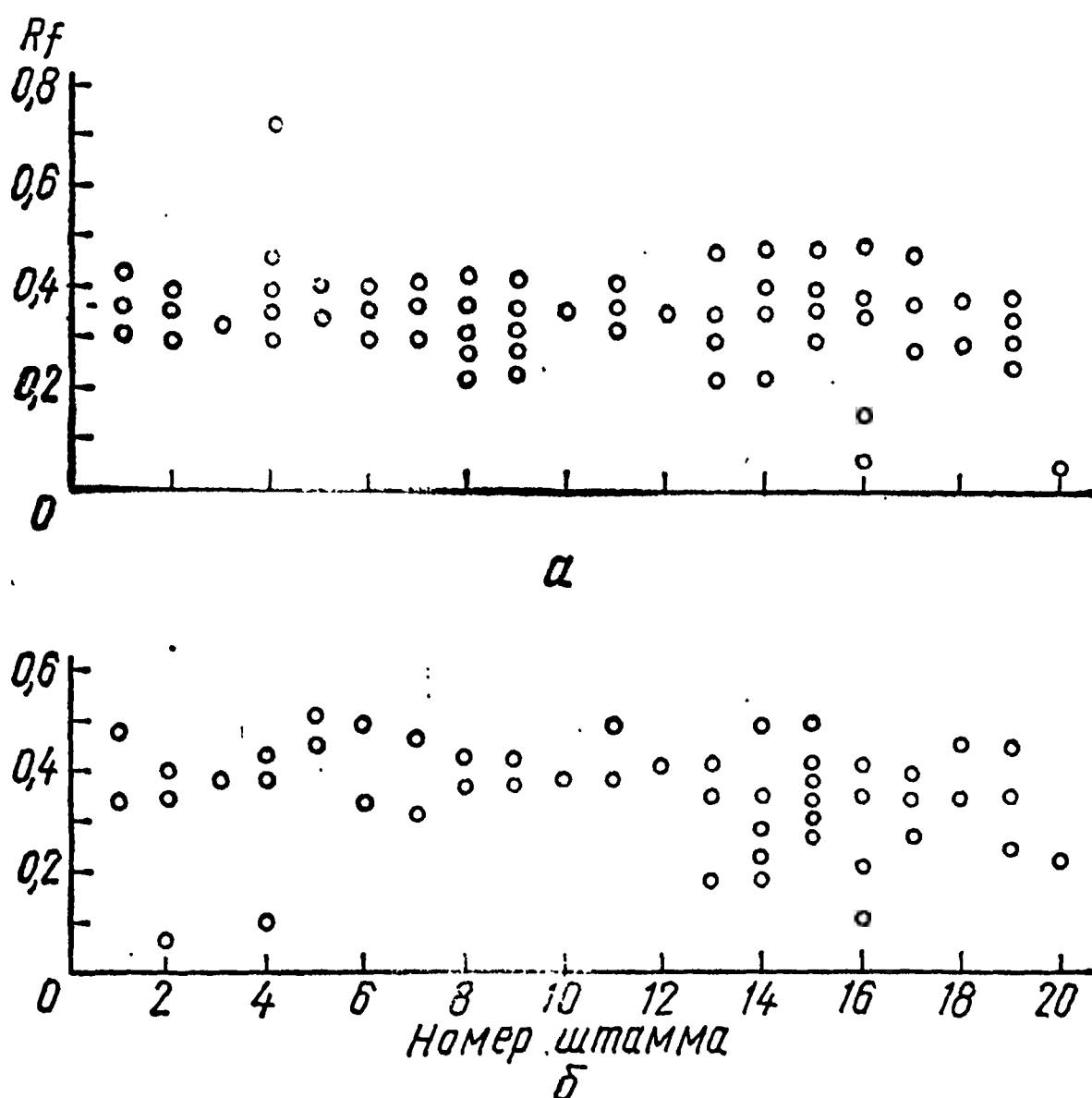


Рис. 113. Тонкослойные хроматограммы экстрактов мицелия 19 видов грибов рода *Penicillium*:

1 — *P. steckii* Lab. 2 — *P. lanoso-caeruleum* Thom.; 3 — *P. martensii* Biorge; 4 — *P. roseo-purpureum*, Dierckx; 5 — *P. chrysogenum* Thom; 6 — *P. claviforme* Bain.; 6 — *P. godlewskii* Zaleski; 7 — *P. raistrickii* G. Smiths; 8 — *P. puberulum* Bain.; 9 — *P. claviforme* Bain.; 10 — *P. canescens* Sopp; 11 — *P. cyano-fulvum* Biorge; 12 — *P. cyclopium* Westling; 13 — *P. pusillum* Smith; 14 — *P. meleagrinum* Biorge; 15 — *P. restrictum* Gilman et Abb; 16 — *P. roqueforti* Thom; 17 — *P. sizovae* Bagh.; 18 — *P. gorklenkoanum* Bagh.; 19 — *P. raxilli* Bain.; 20 — рекефертин (алкалоидная фракция из *P. roqueforti*); а — проявитель — абсолютный хлороформ, обнаружение реактивом Ван-Урка; б — проявитель — абсолютный хлороформ — этанол (190 : 5 по объему), обнаружение реактивом Ван-Урка [4].

ХІ.4. ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Приведенный выше метод качественного выявления алкалоидов, несмотря на значительный объем операций, не дает окончательного ответа о их наличии, так как применяемые реактивы дают положительные реакции со многими азотсодержащими веществами. Следующий этап оценки способности микроорганизмов к синтезу алкалоидов предусматривает применение методов ТСХ [30].

ТСХ проводят на незакрепленном слое окиси алюминия (МРТУ 6—09—2046—64 V активности по Брокману) и силикагеля (смесь силикагелей L40/100М и LC 5/40М в соотношении 10 : 1), желательна хемапол или его аналог. Толщина слоя 0,1—0,2 см, размер пластинок 12 × 18 или 18 × 25 см (размер пластинок может быть иным в зависимости от целей исследования). В качестве проявителей используют в основном две системы: 1) абсолютный хлороформ; 2) смесь абсолютного хлорофор-

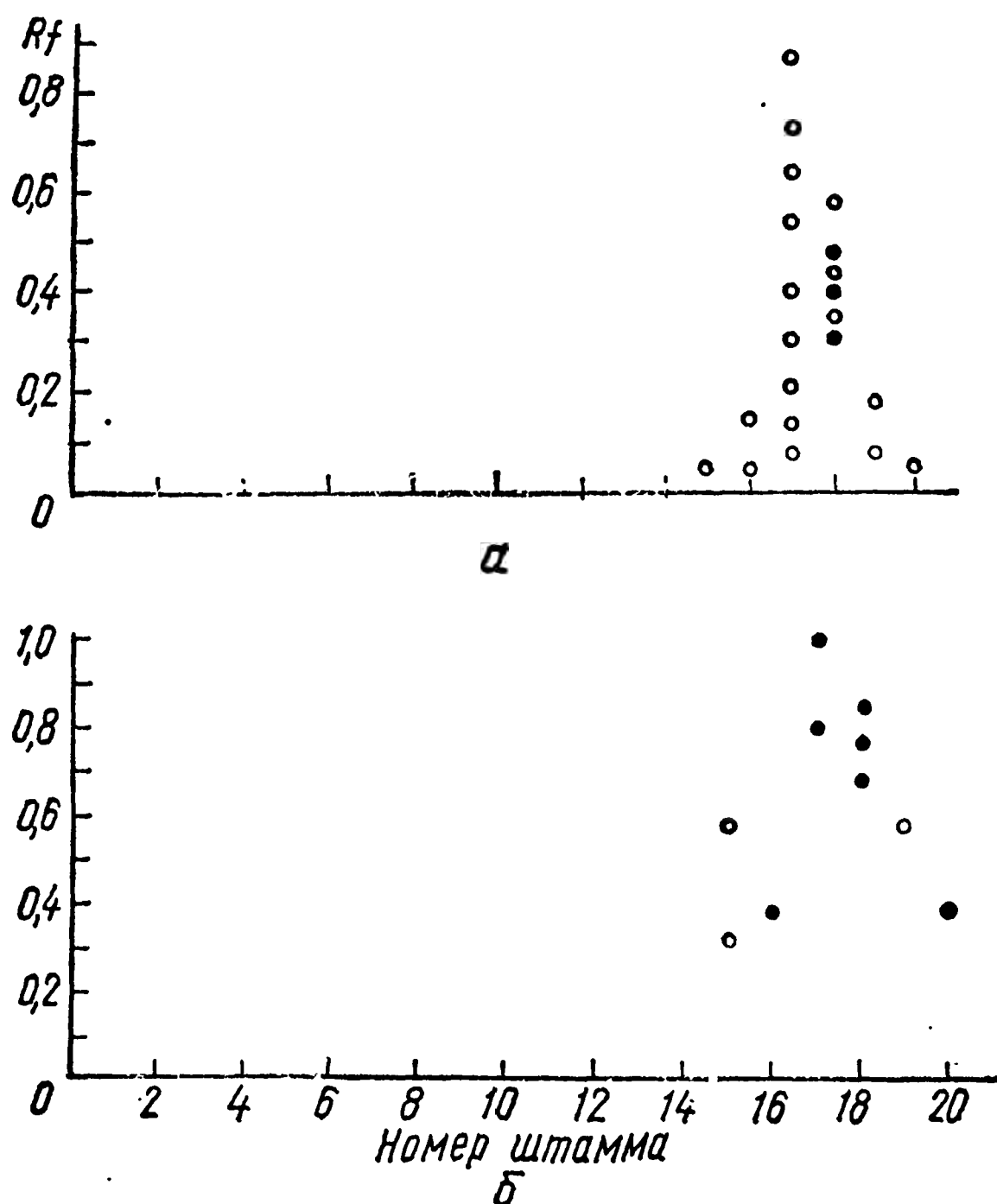


Рис. 114. Оценка содержания алкалоидов в культурах *P. restrictum*, *P. roqueforti*, *P. sizovae*, *P. gorlenkoanum*, *P. raхilli* (штаммы 15—19) с помощью реактива Драгендорфа:

а — проявитель — абсолютный хлороформ: ● — пятна ярко-оранжевого цвета, ○ — пятна светло-оранжевого цвета; б — проявитель — хлороформ — этанол (190 : 5 по объему) [4].

ма с этанолом (190 : 5 по объему). В связи с тем что алкалоиды относятся к разнообразным классам химических соединений, число систем проявителей может быть увеличено, исходя из конкретных задач [15, 481].

Образец, исследуемый на содержание алкалоидов, растворяют в проявителе и наносят на хроматографическую бумагу по 500 мкг раствора. Обнаружение фракций алкалоидов осуществляют с помощью реактива Драгендорфа, йодплатината калия или реактива Ван-Урка, дающими положительную реакцию с индольными производными и эрго-алкалоидами. При проведении подобной операции удастся показать, что положительная реакция на алкалоиды обусловлена присутствием в данной пробе не одного, а нескольких соединений (рис. 113, 114).

ХИИ. ИЗУЧЕНИЕ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Фитотоксинами принято называть продукты обмена микроорганизмов, подавляющие или задерживающие рост и развитие высших растений. Фитотоксины представляют собой разнородную в химическом отношении группу веществ, объединенных по характеру биологического действия.

ХИИ.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУР МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Для определения фитотоксичности культур микроскопических грибов их выращивают на жидких питательных средах, чаще всего на синтетической среде Чапека. Токсичность культуральной жидкости определяют на 7—10-й день роста при поверхностном и на 5-й день при погруженном культивировании. Перед определением токсичности культуральную жидкость отделяют от мицелия фильтрованием.

Если микроскопические грибы плохо растут на искусственных питательных средах, что чаще всего наблюдается у фитопатогенных грибов, выделенных из естественных субстратов, целесообразно использовать для развития этих микроорганизмов природные субстраты (зерно, солому, стебли и т. д.). Стерильные увлажненные субстраты заражают чистыми культурами грибов и выращивают в течение 15 дней. Фитотоксические вещества экстрагируют с помощью растворителей. Полученные экстракты непосредственно или после упаривания под вакуумом используют для определения фитотоксической активности. Контролем служат экстракты из субстратов, на которых не росли грибы.

Для обнаружения фитотоксинов используют биологические, химические и физические методы. Достаточно объективными и точными могли бы быть химические и физико-химические методы. Однако сведения о химической природе токсинов недостаточны для разработки надежной методики. Кроме того, фитотоксический эффект может быть обусловлен не одним веществом, а группой веществ (синергидное действие). В таких случаях, даже зная химический состав смеси, не всегда можно предсказать ее биологическое действие. Поэтому для обнаружения фитотоксических веществ используют главным образом растительные тесты, основанные на способности фитотоксинов задерживать или

подавлять рост растений. Эти методы должны удовлетворять нескольким требованиям: высокая чувствительность, простота и скорость выполнения. Ниже приведены наиболее применяемые из них.

XII.1.1. БИОПРОБА НА СЕМЕНАХ РАСТЕНИЙ

Широко распространенный метод [38, 39, 53, 60, 198, 306]. Семена замачивают в культуральной жидкости в течение 24 ч. Для каждого варианта берут не менее 50 крупных и 100 мелких семян. Контрольные семена замачивают в воде и стерильной питательной среде. В зависимости от целей опыта используют семена разных растений. Для первичного отбора грибов — продуцентов фитотоксинов — чаще всего используют семена пшеницы и гороха. Мелкие семена ряда растений (редис, капуста и др.) в опыт брать не следует, так как чистая питательная среда сама по себе тормозит их прорастание. После суточного замачивания семена раскладывают на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри, увлажняют равным количеством водопроводной воды и проращивают в течение 5—7 дней при постоянной температуре. Наличие в культуральной жидкости фитотоксинов определяют по ростовым эффектам: количеству проросших семян и длине проростков и корней. Токсичными считают культуры, вызывающие снижение всхожести семян или угнетение роста проростков и корней не менее чем на 30% по сравнению с контролем.

XII.1.2. БИОПРОБА НА ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ [41]

Семена кукурузы промывают и замачивают в течение 5 ч в теплой воде. Затем их раскладывают в кюветы на влажную фильтровальную бумагу зародышем вверх и проращивают 1,5—2 сут в термостате при температуре 25—26° С. Для опытов используют проростки с длиной корней 1—2 см.

Для определения фитотоксической активности гриба кончики корней (точку роста и меристематическую зону) проростков кукурузы помещают на 1 ч в культуральную жидкость. Контрольные проростки помещают в воду и стерильную питательную среду. После этого проростки раскладывают в кюветы на влажную фильтровальную бумагу, кюветы помещают в термостат (25—26° С). Через 24 ч измеряют длину корней в опыте и контроле и рассчитывают фитотоксическую активность ингибирования роста корней (%) по формуле

$$A_{\phi} = 100 - \left(\frac{D_x - D_n}{D_k - D_n} \cdot 100 \right), \quad (1)$$

где D_x — средняя длина корней проростков через 24 ч в опыте (мм); D_k — средняя длина корней проростков через 24 ч в контроле (мм); D_n — начальная длина корней проростков (мм).

В качестве биотестов (в зависимости от целей опыта) могут быть использованы и проростки других однолетних растений. Но наиболее пригодными, особенно для первичного отбора грибов — продуцентов фитотоксинов, и чувствительными являются проростки кукурузы, благодаря значительной скорости прорастания и роста (за сутки прирост достигает до 5 см) и четкой зависимости роста от наличия в культуральной жидкости фитотоксинов.

ХИ.1.3. БИОПРОБА НА ПРОРОСТКАХ ПЛОДОВЫХ И ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ [39, 40]

Для получения проростков стратифицированные семена промывают и замачивают в водопроводной воде в течение 3-х сут. Удаляют верхнюю и внутреннюю семенные оболочки, семена раскладывают в чашки Петри на увлажненную вату и ставят в термостат для проращивания во влажной камере при температуре 24—25° С и периодической аэрации.

В опытах используют проростки с корнями и гипокотильями одинаковой длины. Проростки помещают в культуральную жидкость, разлитую в пробирки емкостью 20 мл, и выращивают при комнатной температуре в течение 7—10 дней. В пробирках проростки поддерживаются капроновой сеткой. Для опытов берут не менее 10 проростков. Контрольные проростки выращивают в воде и стерильной питательной среде. Следует отметить, что чистая питательная среда может вызвать угнетение роста проростков некоторых растений, особенно если источником углерода служит сахароза. В таких случаях применяют разведение среды и культуральной жидкости 1 : 10. В конце опыта измеряют длину корней проростков и рассчитывают фитотоксическую активность по формуле (1).

ХИ.1.4. БИОПРОБА НА ЛИСТОВЫХ И СТЕБЛЕВЫХ ТКАНЯХ ПРОРОСТКОВ И ВЕГЕТИРУЮЩИХ РАСТЕНИЙ [46, 235, 297]

Культуральную жидкость с помощью ватного тампона, кружков фильтровальной бумаги или стеклянной палочки наносят на стебель, листовую пластинку или центральную жилку листа. Контролем служит стерильная питательная среда. Наличие токсина определяют по появлению и характеру некрозов, ожогов, обесцвечиванию, засыханию пораженной ткани, скручиванию листьев, отставанию развития растения по сравнению с контролем и другим изменениям.

ХИ.1.5. БИОПРОБА НА ДИСКАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ И ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ

Из листьев или семядолей растений одного возраста вырезают пробочным сверлом диски диаметром 1—2 см и опрыскивают или смачивают их культуральной жидкостью. Можно также использовать целые, изолированные листья и семядоли. Диски или листья помещают в чашки Петри на увлажненную водой фильтровальную бумагу и выдерживают несколько дней при температуре 20—22° С. Через определенные промежутки времени отмечают появление некротических пятен, ожогов, изменение цвета и другие изменения. В конце опыта определяют сырую массу листьев или дисков.

ХИ.1.6. БИОПРОБА НА ЧЕРЕНКАХ И СРЕЗАННЫХ ПОБЕГАХ РАСТЕНИЙ

В культуральную жидкость, налитую в химические стаканы, помещают побеги или черенки растений. Контролем служит вода и стерильная питательная среда. О наличии токсина судят по степени увядания побегов, развития корней и распускания листьев у черенков.

XII.1.7. БИОПРОБА НА ХЛОРЕЛЛЕ [CHLORELLA VULGARIS L.] [311]

Чашки Петри с сусло-агаром или агаром Чапека инокулируют исследуемыми микроорганизмами уколом микологического крючка. Через 24—48 ч инкубации в термостате при 26° С эти же чашки заливают вторым слоем агаризированной питательной среды (1—3 мм) следующего состава (г/л): 5,0 KNO₃; 0,3 KH₂PO₄; 0,3 MgSO₄ · 7H₂O; 5,0 пептона; 10,0 глюкозы; 1 мл микроэлементов; 15,0 агар-агара; pH 6,5, содержащей взвесь клеток хлореллы (смыв с одного косяка 3—5-дневной культуры, выращенной на той же среде, в 500 мл питательной среды) и ставят в светотеплицу с температурой 26° С. Через 4—5 сут инкубации вокруг микроорганизмов — продуцентов фитотоксических веществ — образуются ясно выраженные зоны отсутствия роста хлореллы.

XII.1.8. БИОПРОБА НА РЯСКЕ [LEMNA MINOR L.] [312]

В чашки Петри, содержащие по 10 мл испытуемых растворов, вносят по 0,2 г ряски, предварительно обсушенной фильтровальной бумагой, и оставляют на ночь при комнатной температуре. На следующий день исследуемые жидкости осторожно сливают, ряску дважды промывают 10 мл стерильной воды и культивируют в течение недели в светотеплице с 10-часовым световым днем при 26° С в 20 мл органо-минеральной среды Хогланда следующего состава (мг/л): 61,0 KNO₃; 95,0 Ca(NO₃)₂ × 4H₂O; 49,0 MgSO₄ · 7H₂O; 12,0 NH₄H₂PO₄; 0,5 железа виннокислого; 1000 сахарозы; 0,1 мл микроэлементов. Затем биомассу отфильтровывают, обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают. Часть ряски после взвешивания используют для определения содержания хлорофилла.

XII.1.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ТОКСИЧНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ [297]

Степень токсичности сильно фитотоксичных штаммов определяют следующим образом. Готовят серию разведений культуральной жидкости так, чтобы каждое последующее разведение было в 2 раза больше предыдущего. Для разведения пригодна водопроводная вода. Находят наименьшее разведение, при котором еще обнаруживается фитотоксическое действие культуральной жидкости. Активность культуральной жидкости определяют числом единиц, равным наименьшему разведению, при котором еще проявляется фитотоксическое действие.

XII.1.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФИТОТОКСИНОВ

Разные виды растений обладают неодинаковой чувствительностью к фитотоксинам. Для выявления специфического и селективного действия этих веществ используют набор растений — представителей разных семейств. Для выявления селективного действия фитотоксинов на однодольные и двудольные растения в качестве тестов лучше всего использовать семена пшеницы и огурцов. При изучении фитотоксической актив-

ности культур микроскопических грибов целесообразно использовать несколько биотестов, основанных на разных ростовых реакциях. Это позволяет выявить органотропное и специфическое действие фитотоксинов на процессы роста.

XII.2. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФИТОТОКСИНОВ НА РАСТИТЕЛЬНУЮ КЛЕТКУ

XII.2.1. ДЕЙСТВИЕ ФИТОТОКСИНОВ НА ПРОТОПЛАЗМУ

Методы основаны на характерных свойствах живой протоплазмы, таких, как способность к движению и адсорбции разных соединений, в частности красящих веществ. В мертвой клетке движение протоплазмы прекращается, и красящие вещества (пигменты), которые находятся в вакуолях, легко диффундируют из протоплазмы в воду.

XII.2.1.1. ДЕЙСТВИЕ ФИТОТОКСИНОВ НА ДВИЖЕНИЕ ПРОТОПЛАЗМЫ

Листья элодеи (*Elodea canadensis*) просушивают на фильтровальной бумаге, помещают в опытный раствор на вогнутом предметном стекле и исследуют микроскопически. Отмечают время, через которое прекращается движение протоплазмы.

XII.2.1.2. ДЕЙСТВИЕ ФИТОТОКСИНОВ НА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ КЛЕТКИ И СТЕНКИ ВАКУОЛЕЙ

Из свежей свеклы (*Beta vulgaris* f. *rubra*) пробочным сверлом вырезают столбики диаметром 14—20 мм и разрезают их на диски толщиной 3—4 мм и массой 0,5 г. Диски отмывают в проточной воде до прекращения выделения антоциана с поверхности поврежденных клеток. Помещают диски в испытуемые растворы и оставляют в холодильнике на 24 ч. Выход антоциана определяют с помощью ФЭКа.

XII.2.2. ДЕЙСТВИЕ ФИТОТОКСИНОВ НА МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Размножение клеток является основой роста и морфогенеза растений. Действие фитотоксинов на митоз определяют по митотической активности меристематических тканей.

Трехдневные проростки гороха (или другого растения) помещают в раствор токсина и выдерживают в термостате 48 ч при 26—27° С. Затем концы корешков (5—7 мм) фиксируют смесью Карнуа (3 части этилового спирта и 1 часть уксусной кислоты) и окрашивают ацетокармином (2%-ный раствор кармина растворяют при кипячении в 45%-ной уксусной кислоте). Митотическую активность меристематических тканей изучают на давленных препаратах. В 10 полях зрения микроскопа отмечают количество делящихся клеток из 100 и рассчитывают митотический индекс по формуле: количество делящихся клеток / 1000 × 100%.

ХИ.2.3. ДЕЙСТВИЕ ФИТОТОКСИНОВ НА РАСТЯЖЕНИЕ КЛЕТОК

Действие фитотоксинов на растяжение клеток лучше всего изучать в зоне растяжения растущей части корня. Проростки кукурузы (или другого растения) помещают на 1 ч в раствор токсина. Затем опытные и контрольные проростки выращивают на фильтровальной бумаге, увлажненной водой, в кюветах в термостате при температуре 26—27° С. Через определенные промежутки времени измеряют длину корней линейкой с точностью ± 1 мм и длину растягивающихся клеток (на продольных срезах живых корней, сделанных от руки с помощью окулярной линейки под микроскопом (лучше всего на МБИ-11) при увеличении в 100 раз).

ХИ.3. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФИТОТОКСИНОВ НА РАСТЕНИЯ МЕТОДОМ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ [81, 413]

Культура изолированных органов и тканей представляет весьма удобную живую модель для сравнительного изучения многих процессов роста и метаболизма растительного организма, в котором эти процессы протекают в условиях сложных взаимоотношений и коррелятивных связей. Использование изолированных тканей и органов растений в качестве биотестов для изучения действия фитотоксических веществ имеет преимущество перед другими методами вследствие быстроты и удобства проведения опытов в строго контролируемых условиях.

ХИ.3.1. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ

В изолированной культуре обычно выращивают прокамбиальные ткани стебля, ткани, содержащие первичный и вторичный камбий, сосудистую паренхиму корнеплодов и клубней и др.

Прокамбиальную ткань стебля готовят следующим образом. Сегменты мясистого стебля растений (табак, подсолнечник, томаты и др.), изолированные в зоне второго и третьего междоузлий, моют, стерилизуют и часть первичной коры удаляют скальпелем. Затем кусочки ткани длиной 2—2,5 см или диски толщиной 2—3 мм переносят на питательную среду, соблюдая условия физиологической полярности, т. е. помещая отрезок стебля апикальным концом в питательную среду.

Для получения тканей мясистых корней и клубней отбирают здоровые, непораженные вредителями корнеплоды и клубни, чистят их, тщательно моют и помещают между листами стерильной бумаги. Затем в продольном направлении извлекают из них длинные столбики (с помощью пробочного сверла) диаметром 3—5 мм, которые разрезают на диски толщиной 1,5—2,0 мм. Для опытов берут ткань обычно из верхней трети корнеплода. Аналогичным образом готовят листовую ткань, которую культивируют с целью изучения закономерностей роста и метаболизма части пластинки молодого листа.

Для стерильных органов и тканей растений, из которых изолируется ткань для культуры, существует набор различных стерилизующих веществ. Наиболее распространенными являются растворы, содержащие активный хлор: гипохлориты кальция и натрия, хлорная известь, хлор-

амины. Растворы готовят следующим образом: определенное количество вещества перед употреблением взбалтывают в 1 л воды в течение 10 мин, затем отфильтровывают и используют для стерилизации растительного материала.

Для культивирования изолированных тканей предложено много питательных сред. Большинство нормальных тканей выращивают обычно на среде Хеллера, в состав которой входят (мг/л): 750 KCl; 600 NaNO₃; 250 MgSO₄ · 7H₂O; 125 NaH₂PO₄ · H₂O; 75 CaCl₂ · H₂O; 20 000 сахарозы и 1 мг/л раствора микроэлементов. Раствор микроэлементов по Хеллеру состоит из (мг/л): 1 FeCl₃ · 6 H₂O; 1 ZnSO₄ · 7H₂O; 1 H₃BO₃; 0,1 MgSO₄ · 4H₂O; 0,03 CuSO₄ · 5H₂O; 0,03 AlCl₃; 0,03 NiCl₂ · 6H₂O; 0,01 KJ. Среду стерилизуют при давлении 1 атм в течение 10—15 мин. К питательной среде перед автоклавированием добавляют раствор фитотоксина. В контроле вместо раствора фитотоксина добавляют такое же количество воды.

Изолированные ткани выращивают на поверхности полутвердой агаровой питательной среды или в жидкой среде. В первом случае сегменты стебля и большие кусочки тканей корнеплода или клубни погружают в агар на $\frac{1}{3}$ их длины, маленькие диски и кубики тканей помещают на поверхность среды. При этом способе выращивания тканей, находясь в воздухе, хорошо аэрируется, что очень важно для роста культуры. Культивирование тканей в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед первым способом (ткань лучше снабжается питательными веществами, легче происходит удаление токсических веществ и т. п.), но требует аэрации.

Культуру тканей выращивают в темноте при температуре 26—27° С. Аэрация обеспечивается выращиванием на качалках, роллерах или (в жидкой среде) барботажем воздухом. В конце опыта определяют сырую массу культуры и, в зависимости от целей опыта, различные физиологические и биохимические показатели. Характеристикой роста является прирост ткани за определенный отрезок времени (%): $W = [(W_t - W_0)/W_0] \cdot 100$, где W_t — конечная, W_0 — начальная масса культуры.

ХИИ.3.2. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ КОРНЕЙ

Стерильные семена растений (люцерны, гороха, пшеницы, кукурузы и др.) проращивают в стерильных условиях в чашках Петри на водном агаре в темноте при температуре 25—27° С. После прорастания семян от проростков отрезают стерильными ножницами кончики корней длиной 2—3 см и переносят в колбы с питательной средой. Для получения надежных и четких результатов в опытах следует использовать корни клонового происхождения, т. е. полученные путем вегетативного размножения от одного исходного корня, взятого от проростка. Для стерилизации семян используют водные растворы хлорамина (3—6%-ный), сулемы (0,1%-ный), этанола (95%-ный), пергидроля (2—8%-ный).

Изолированные корни выращивают на стерильной жидкой или агаризованной (1% агара) питательной среде Смирнова, содержащей (мг/л): 80KNO₃; 200Ca (NO₃)₂; 65KCl; 18,6NaH₂PO₄ · 2H₂O; 740MgSO₄ × 7H₂O; 200Na₂SO₄; 3,5 FeC₆H₅O₇ · 3H₂O; 3,6MnCl₂ · 4H₂O; 2,2 ZnSO₄ · 7H₂O; 1,4 H₃BO₃; 0,65 KJ; 0,025 Na₂MoO₄ · 2H₂O; 0,004CuSO₄ · 5 H₂O; 0,5 никотиновой кислоты; 0,1 тиамин; 0,1 пиридоксин; 20 000 сахарозы. К питательной среде перед автоклавированием добавляют раствор фитотоксина. Корни выращивают в темноте при темпера-

туре 27° С и относительной влажности воздуха 70%. Результаты опыта учитывают после 7-дневного роста. Измеряют длину главных корней и суммарную длину всех боковых на каждом корне, подсчитывают число боковых корней и определяют сырую массу главных корней. Средние данные по вариантам опыта приводят по этим показателям роста в расчете на один корень.

XII.3.3. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

Культура изолированных листьев не требует стерильных условий и использования специальных питательных сред. Особенно это касается культуры целых листьев. Для успешного культивирования изолированных листьев важен выбор объекта с учетом целей работы и способности изолированных листьев к укоренению. Легко укореняются листья двудольных растений. Поэтому их чаще всего используют для опытов. Предпочтение следует отдавать молодым листьям, а также листьям молодых и сильных растений. Целесообразно также использовать семядоли, которые у многих двудольных растений хорошо укореняются и могут самостоятельно существовать в течение нескольких месяцев.

Изолированные листья культивируют в сосудах с водой или питательным раствором, в который вносят раствор фитотоксина. Листья выращивают в теплицах или боксах под прозрачной пленкой в условиях естественного освещения или при освещении люминесцентными лампами; их ежедневно поливают или опрыскивают водой. В конце опыта учитывают сырую массу листьев и способность листовых черенков к корнеобразованию. Изолированные диски из листьев выращивают как в стерильных, так и нестерильных условиях. Культивирование тканей листьев в стерильных условиях описано в разделе XII.3.1.

Для культивирования в нестерильных условиях диски вырезают из листьев разного возраста: из молодых — перед началом фазы наиболее интенсивного прироста числа клеток, из листьев среднего возраста — в конце фазы деления. Диски вырезают пробочным сверлом диаметром 6—12 мм из участков листа без крупных жилок. Вырезанные диски помещают в чашки Петри с 10—15 мл 1%-ного раствора сахарозы, приготовленного на растворе Кнопа, взятого в пятикратном разведении. Диски инкубируют в условиях естественного освещения или при круглосуточном освещении люминесцентными лампами. Ежедневно диски после тщательной промывки в дистиллированной воде переносят в новые инкубационные среды. В конце опыта определяют сырую массу дисков и количество клеток. Количество клеток определяют в счетной камере Фукса — Розенталя после 30—45-минутной мацерации ткани на кипящей водяной бане в растворе 5%-ной уксусной кислоты, приготовленной на 2 н. растворе соляной кислоты.

XII.4. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОСТУПЛЕНИЯ ФИТОТОКСИНОВ В РАСТЕНИЯ

Растения выращивают в химических стаканах с питательным раствором, в который вносят испытуемый фитотоксин. Фитотоксин добавляют в количестве, не вызывающем гибели растений. Растения в стаканах поддерживаются парафинированной марлей. В качестве субстрата используют также почву или песок, в которые внесен раствор фито-

токсина. Таким образом изучают корневое поглощение фитотоксинов из растворов и почвы.

Для изучения поглощения фитотоксинов семенами и дальнейшего их распределения в растущем растении семена замачивают в течение суток в растворе фитотоксина, затем вынимают из раствора, промывают дистиллированной водой и раскладывают на увлажненную фильтровальную бумагу для проращивания. Проростки высаживают на парафиновые кружки в стаканы с питательным раствором. Через определенные промежутки времени отбирают растения для анализа и расчленяют на отдельные органы (корни, стебель, листья). Отобранные пробы растирают в ступке и из полученной кашицы отжимают сок. Фитотоксические вещества в соке определяют с помощью биотестов. Так как из тканей растений отжимается малое количество сока, то лучше всего применять биотест на рост корней кресс-салата. Семена кресс-салата проращивают на увлажненной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 27° С в течение 12 ч. Полоски фильтровальной бумаги шириной 2 см смачивают 1 мл полученного сока и на них раскладывают по 10 проросших семян кресс-салата с корешками одинаковой длины (3 мм). Контролем служит полоска фильтровальной бумаги, смоченная соком, полученным из растений, не подвергавшихся действию фитотоксина. Через сутки измеряют прирост корней проростков и результаты выражают в процентах ингибирования роста. По угнетению роста корней проростков судят о наличии фитотоксина в отдельных органах растений [297].

Если фитотоксические вещества обладают антибиотической активностью, целесообразно в качестве биотестов применять чувствительные к ним культуры микроорганизмов. В этом случае из полученной кашицы делают комочки и раскладывают их в чашки Петри на газон чувствительного к фитотоксину тест-организма. После инкубации в термостате измеряют размер зоны подавления роста тест-организма и по их величине судят о накоплении фитотоксина в разных органах растений. Для более точного определения локализации фитотоксина растения целиком вынимают из раствора, промывают водой, обсушивают фильтровальной бумагой и раскладывают в рамки на двухслойный агар с тест-организмом. Рамки закрывают стеклом и помещают в термостат. Места накопления токсина обнаруживают по образованию зон отсутствия роста тест-микроорганизма.

ХИ.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУЗАРИЕВОЙ КИСЛОТЫ У ГРИБОВ

ХИ.5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Токсические вещества, образуемые рядом фитопатогенных грибов, нередко являются одной из причин преждевременного увядания многих видов растений. К числу таких соединений относится и фузариевая, или 5-н-бутилпиколиновая, кислота [28, 29, 61, 69, 70, 523, 595, 596, 661, 643, 644, 648], которая образуется не только *F. oxysporum*, но и *F. moniliforme*.

Поскольку фузариевая кислота ингибирует прорастание спор *Ustilago zeae* (головни кукурузы) (до 50%), рост некоторых микроорганизмов, таких, как *Bacillus subtilis* и *Bac. mesentericus* и некоторых других, эти бактерии используют для определения фузариевой кислоты в культуральной жидкости.

ХИ.5.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ

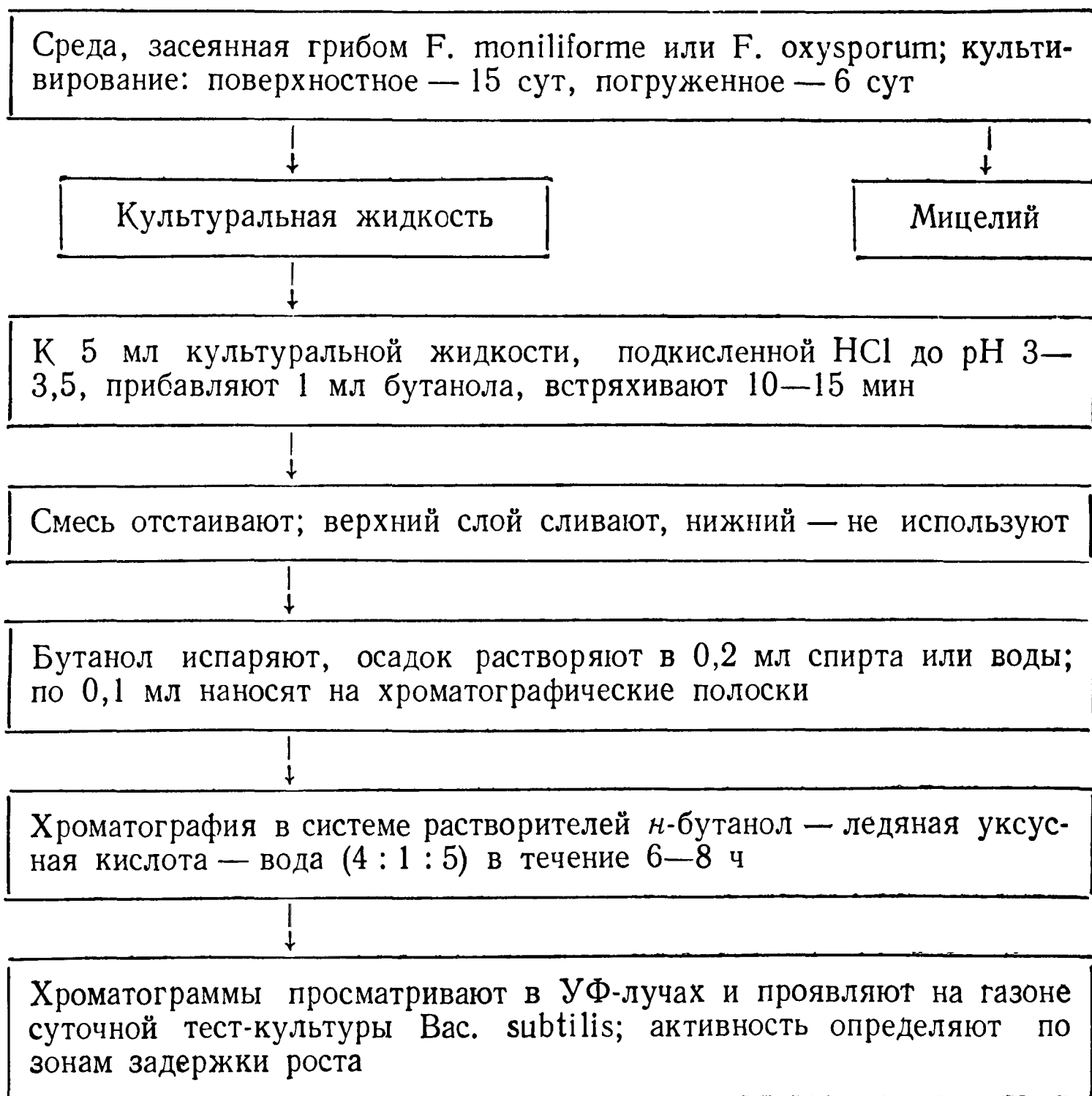
Изучаемые культуры грибов выращивают методом поверхностного (30—40 сут) или погруженного культивирования (6 сут) на жидкой среде Чапека. Состав среды (г): 2 KNO_3 ; 1 KH_2PO_4 ; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 KCl ; 0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 30 сахарозы; 1 л воды; pH 5,0 — 5,5.

По 10 мл питательной среды разливают в пробирки, засевают культурой изучаемых грибов и выращивают методом поверхностного или погруженного культивирования на пробирочных качалках при температуре 26° С [68].

ХИ.5.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ФУЗАРИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Культуральную жидкость отделяют от мицелия фильтрованием через бумажные фильтры, подкисляют до pH 3,5 2 н. раствором соляной кислоты, добавляют бутанол в соотношении 1 : 5. Смесь взбалтывают в делительной воронке в течение 10 мин. После разделения слоев верхний бутанольный слой сливают в испарительные чашки, а нижний не используют. Испарение проводят током холодного воздуха в вытяжном

Схема выделения фузариевой кислоты



шкафу. Полученный осадок растворяют в 0,2 мл воды или спирта (схема).

Для получения фузариевой кислоты в кристаллическом виде доводят рН культуральной жидкости 2 н. раствором соляной кислоты до 4,0 и тщательно взбалтывают с этилацетатом, взятом в соотношении 1 : 5. Смесь отстаивают, в делительной воронке отделяют этилацетат и испаряют. Полученный осадок растворяют в небольшом количестве воды, подщелачивают бикарбонатом натрия до рН 8—8,5. Препарат очищают, встряхивая дважды с половинным объемом эфира. Затем культуральную жидкость отделяют, снова подкисляют до рН 4,0, добавляют пятикратный объем эфира и снова тщательно взбалтывают. Эфир сливают в испарительные чашки. После испарения эфира образуются кристаллы фузариевой кислоты розоватого цвета.

ХИИ.5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУЗАРИЕВОЙ КИСЛОТЫ

ХИИ.5.4.1. МЕТОД БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Определение фузариевой кислоты проводят методом восходящей бумажной хроматографии с последующим биоавтографическим проявлением на тест-культуре *Bac. subtilis*.

0,1 мл растворенного осадка элюата наносят на полосы хроматографической бумаги 23×1 см на расстоянии 1,5 см от нижнего края. Полоски помещают в пробирки высотой 20 см, диаметром 2 см, содержащие 5 мл смеси растворителей бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5. После разгонки полоски хроматографической бумаги просушивают в токе холодного воздуха и просматривают в УФ-лучах (R_f фузариевой кислоты 0,87—0,88, с темно-серым или красно-коричневым свечением). Затем приступают к биоавтографическому проявлению хроматограмм.

Наличие фузариевой кислоты определяют на газоне суточной культуры *Bac. subtilis* по образованию стерильных зон вокруг хроматограмм, помещенных на бактериальный газон. Среди фузариев встречаются штаммы, культуральная жидкость которых при хроматографии образует пятна, имеющие в УФ-лучах различные оттенки голубого цвета. R_f таких пятен колеблется от 0,50 до 0,55. При биоавтографическом проявлении хроматограмм отмечено совпадение зон угнетения роста *Bac. subtilis* с расположением пятен с R_f 0,50—0,55.

Изучаемые культуры фузариев могут образовывать три типа зон угнетения тест-культуры. Первый тип характеризуется зоной угнетения роста *Bac. subtilis* у фронта растворителя с R_f 0,87—0,88, второй — у фронта растворителя и в средней части полосы с R_f 0,50—0,55, третий — в точке нанесения вещества (вещество в данном растворителе не разгоняется). Следует отметить, что размер зон угнетения роста *Bac. subtilis* неодинаков у разных штаммов фузариев (рис. 115). Это свидетельствует о многообразии веществ, ингибирующих рост тест-культуры.

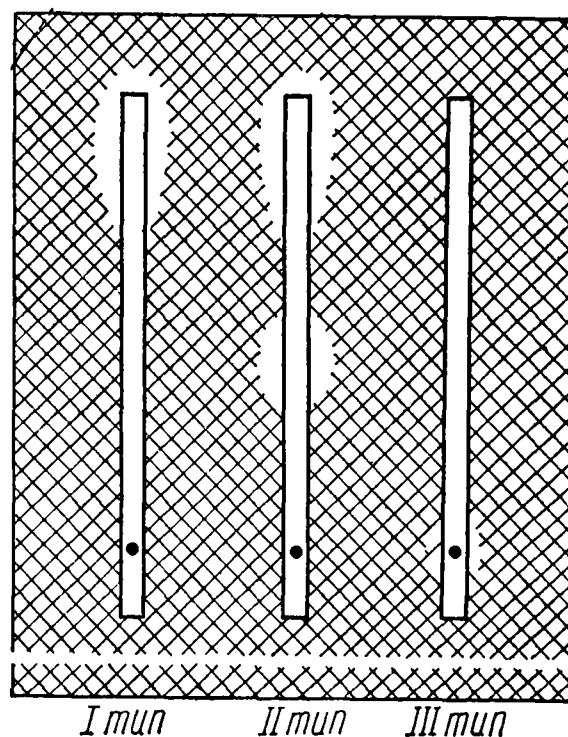


Рис. 115. Зоны угнетения роста тест-культуры *Bac. subtilis* (точки — место нанесения вещества).

XII.5.4.2. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Силикагель размельчают в фарфоровой ступке или на шаровой мельнице, затем просеивают через сито (размер частиц 120 меш). Гипс перед размельчением просушивают 6 ч при температуре 60° С, размалывают в ступке, просеивают через такое же сито. Стеклоянные пластинки размером 17,5 × 13 см погружают на сутки в хромовую смесь для обезжиривания, тщательно моют и сушат. Для каждой пластинки готовят смесь следующего состава: 2,5 г силикагеля, 150 мг гипса, 8 мл воды. Смесь хорошо перемешивают палочкой, быстро выливают на пластинку, распределяют равномерно стеклянной палочкой, оставляют на сутки для застывания. На следующий день пластинки для активизации прокаливают 2 ч в сушильном шкафу при температуре 100° С, наносят на них 0,1 мл исследуемого вещества и производят разгонку в системе растворителей хлороформ — метанол в соотношении 95 : 5. Пластинки с разогнанным веществом просматривают в УФ-лучах. Фузариевая кислота при этом имеет серо-коричневую окраску и Rf 0,92, пятна с зелено-голубым свечением — Rf 0,55.

XII.5.4.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУЗАРИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Культуральную жидкость проверяют на наличие фузариевой кислоты следующим образом. Семена растений проращивают на двойном слое фильтровальной бумаги, смоченной водой, в чашках Петри 3—4 сут. Проростки помещают в стаканчики, в которые вносят разные разведения фильтрата. Контролем служит вода. На протяжении 10 сут наблюдают за развитием растений, отмечая скорость роста и характер увядания. Обычно используют проростки хлопчатника как наиболее чувствительное тест-растение. Фитотоксическое действие фузариевой кислоты проявляется как в отношении корневой системы, так и стеблей: наблюдается побурение корневого чехлика, потеря тургора в нем и загнивание под действием нативной культуральной жидкости.

Присутствие фузариевой кислоты в культуральной жидкости часто определяют по действию на проростки. Для этого семена гороха или кукурузы раскладывают на увлажненные стерильной водопроводной водой фильтры в кюветах, накрывают сверху увлажненной фильтровальной бумагой для создания необходимой влажности и помещают в термостат при температуре 22° С на 2—3 сут. Наклюнувшиеся семена обрабатывают нативной культуральной жидкостью. В культуральной жидкости семена выдерживают в течение 24 ч, после чего переносят в чашки Петри со стерильным песком. Проростки поливают стерильной водопроводной водой в течение 7 сут и производят учет опыта. Контрольные семена замачивают в воде и помещают в чашки со стерильным песком. При наличии фузариевой кислоты в культуральной жидкости у проростков кукурузы и гороха часто развивается основной корень, но не образуются боковые корни и корневые волоски, или же корневая система слабо развита и имеет уродливую форму.

XII.5.5. ТОКСИЧНОСТЬ ФУЗАРИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Токсичность фузариевой кислоты определяют внутрибрюшинным введением белым мышам (18—22 г) в остром и хроническом опытах [68]. В остром опыте ЛД₁₀₀ препарата составляет 101,5 мг/кг, ЛД₅₀ —

88,8 мг/кг. Животные в большинстве гибнут на вторые сутки после введения. При вскрытии обнаруживают вздутый желудок, увеличенную с округленными краями темно-вишневого цвета печень, переполненную кровью, набухшие почки темно-вишневого цвета; сердце несколько увеличено, сосуды переполнены кровью, легкие полнокровны.

В хронических опытах препарат вводят на протяжении 2 нед в дозе 1,17 мг/животное. При ежедневном введении гибель животных составляет до 50% после 11 инъекций, а при введении через день — около 25% после 6 инъекций. Это свидетельствует об относительно низкой токсичности фузариевой кислоты для животных и ее слабых кумулятивных свойствах. Фузариевая кислота обладает гипотензивным действием, т. е. способностью снижать артериальное давление. При однократном введении фузариевой кислоты кроликам у них снижается артериальное давление, которое восстанавливается через 3—4 ч.

ХІІІ. ИЗУЧЕНИЕ ПРИРОДЫ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Фитотоксические вещества, вырабатываемые грибами, могут быть кислотами и их производными, пептидами, белками, полисахаридами, хинонами, гетероциклическими кислород- и азотсодержащими соединениями и другими веществами. Способы выделения и очистки этих веществ определяются их химической природой, характером сопутствующих продуктов жизнедеятельности организма и неиспользованных компонентов среды (углеводы, неорганические соли и др.), а также местом накопления этого вещества (в культуральной жидкости или в клетке).

Основная задача первых этапов изучения природы фитотоксических веществ грибов — выбор оптимального растворителя для их экстракции.

ХІІІ.1. ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ

Для препаративного выделения и очистки фитотоксических веществ, частичной их характеристики и идентификации используют метод сборной хроматографии на бумаге [42, 43, 66, 297, 309]. Хроматографическую бумагу (Л 2) нарезают полосками шириной 3 и длиной 50 см. На расстоянии 3 см от нижнего края полоски карандашом отмечают линию старта. Вторую линию проводят на расстоянии 25 см от линии старта. Второй линией обозначают фронт прохождения растворителя. На линию старта микропипеткой или медицинским шприцем (объем 1 см³) наносят фильтрат культуральной жидкости в количестве 0,2—0,4 мл, постоянно подсушивая бумагу теплым воздухом. После этого полоски хроматографической бумаги помещают в хроматографические камеры диаметром 5 и высотой 40 см. На дно цилиндров наливают растворители слоем 2—5 см. Полоски помещают в камеры так, чтобы их концы были опущены в растворитель на глубину 0,5 см. Набор растворителей, используемых для хроматографии, в зависимости от целей исследования может быть различным. Для идентификации фитотоксических веществ грибов лучше использовать элюотропный ряд Траппе [248]. Характеристика ряда приведена в табл. 25.

Очевидно, что с уменьшением степени адсорбции в элюотропном ряду, уменьшается растворимость воды в растворителе, а также диэлектрическая проницаемость членов ряда. Поверхностное натяжение на границе между водой и данным членом элюотропного ряда, наоборот, возрастает. Первые члены элюотропного ряда — наиболее сильные элюен-

Т а б л и ц а 25. Элюотропный ряд Траппе

Растворитель	Растворимость воды в раство- рителе, г/100 г	Поверхностное натяжение во- да — раство- ритель, Па	Диэлектриче- ская прони- цаемость
Вода	—	—	81,0
Метанол	—	—	31,2
Этанол	—	—	25,8
Пропиловый спирт	—	—	22,2
Ацетон	—	—	21,5
Этилацетат	3,000	0,63	6,1
Диэтиловый эфир	1,300	0,97	4,4
Хлороформ	0,100	2,77	5,2
Бензол	0,060	3,263,26	2,3
Толуол	0,040	3,60	2,3
Трихлорэтилен	0,020	—	—
Четыреххлористый углерод	0,010	4,34	2,2
Циклогексан	0,010	—	2,0
Гексан	0,007	5,04	1,88

ты. В некоторых случаях в качестве элюентов очень эффективны пиридин и уксусная кислота (пиридин вытесняет химически связанные основания, являясь одновременно хорошим растворителем, а уксусная кислота нарушает хемосорбцию фенолов и органических кислот).

После прохождения растворителем отмеченного расстояния полоски бумаги вынимают и высушивают на воздухе. Следует помнить, что разные растворители движутся по бумаге с различной скоростью, поэтому необходимо следить за движением каждого растворителя. Биоавтографию хроматограмм проводят с использованием микробных и растительных тестов.

ХIII.1.1. МЕТОД РАСТИТЕЛЬНЫХ ТЕСТОВ

[42, 43, 53, 66]

Хроматограмму разрезают на полосы шириной 5 и длиной 3 см. На каждой полосе, помещенной в отдельную кювету или чашку Петри, проращивают в течение 18—24 ч семена кресс-салата. В зависимости от цели опыта можно использовать семена других растений. Участки хроматограммы, содержащие фитотоксические вещества, определяют по степени прорастания семян. Физиологически активная зона характеризуется величиной R_f .

ХIII.1.2. МЕТОД МИКРОБНЫХ ТЕСТОВ [66, 297]

В кювету размером 40 × 25 см, предварительно протертую спиртом, наливают равномерным слоем агаризованную питательную среду, содержащую суспензию клеток микроорганизма, чувствительного к изучаемому фитотоксическому веществу. Для приготовления суспензии используют суточную культуру микроорганизма, чувствительного к

действию фильтрата культуральной жидкости изучаемого штамма. Культуру в пробирке заливают 6 мл стерильной воды, встряхивают и выливают в расплавленную и охлажденную до 40—45° С питательную среду. Питательную среду с культурой снова тщательно встряхивают и разливают тонким слоем в предварительно приготовленную рамку. Полоски бумаги шириной 1 см отрезают до линии фронта растворителя и раскладывают в кювету на застывший агар с используемой культурой параллельно друг другу в определенном порядке. Рамки с хроматограммами ставят в термостат на сутки. Через сутки на агаре в месте скопления фитотоксических веществ появляются стерильные зоны, по которым судят о продвижении вещества в каждом из использованных растворителей элюотропного ряда Траппе. Затем вычисляют R_f фитотоксического вещества. Агаровые пластинки, на которых обнаружены зоны подавления роста тест-микробов, фотографируют в темном поле или в поляризованном свете. На основании значений R_f для каждого растворителя (отдельно в случае растительных и микробных тестов) строят кривые, отражающие зависимость растворимости данного вещества от применяемой системы растворителя. Для построения кривой на ось абсцисс наносят обозначения растворителей, а на ось ординат — значения R_f . Эти данные используют для выбора лучшего растворителя для последующей экстракции или очистки веществ от примесей. Чем больше R_f , тем лучше фитотоксическое вещество растворяется в растворителе и, следовательно, данный растворитель наиболее пригоден для экстракции.

ХIII.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Широкое распространение получили два способа выделения фитотоксических веществ из фильтрата культуральной жидкости грибов: лиофилизация, или упаривание в вакууме, и экстракция растворителями. Первым способом выделяют вещества, которые растворимы в воде и других полярных растворителях. Второй способ универсален.

ХIII.2.1. ЛИОФИЛИЗАЦИЯ, ИЛИ ВАКУУМНАЯ СУШКА **[248]**

Фильтрат культуральной жидкости полностью замораживают в тонком слое и выдерживают в вакууме (0,01—2 мм рт. ст.). Благодаря быстрому испарению воды замороженный раствор постоянно охлаждается. Удаляемые водные пары улавливают в охлаждаемых ловушках или с помощью поглотителей. Поддержание низких температур в процессе упаривания имеет большое значение для сохранения нестабильных фитотоксических веществ. Поскольку работа проводится в относительно глубоком вакууме, нет опасности окисления нестабильных веществ кислородом воздуха. Для нестойких фитотоксических веществ применяют также вакуумную сушку при комнатной температуре.

ХIII.2.2. ЭКСТРАКЦИЯ [248, 250]

Предварительно высушенный материал загружают в сосуд (колбу, склянку) и заливают растворителем. Чаще всего применяют воду, петролейный и диэтиловый эфир, метиловый и изопропиловый спирт, хлороформ, дихлорэтан, бензол, четыреххлористый углерод. Настаива-

ют в течение нескольких часов или даже суток, после чего растворитель сливают через бумажный фильтр и концентрируют. Однако этот способ не всегда позволяет достичь полного извлечения. Только многократным настаиванием в новых порциях растворителя удастся перевести в раствор практически все экстрактивные вещества. Когда требуется накопить извлекаемое вещество в больших количествах, применяют перколяторы или автоматические эксикаторы. Для осуществления экстрагирования разными способами в системе жидкость — жидкость пригодна обычная делительная воронка. Как правило, применяют коническую делительную воронку.

Делительную воронку фиксируют в железном или фарфоровом кольце, укрепленном на штативе. Воронка закрывается стеклянной пришлифованной пробкой. Кран делительной воронки необходимо предварительно проверить на герметичность водой или эфиром и в случае необходимости притереть. Следует помнить, что воронку надо заполнять обеими фазами не более чем на $\frac{2}{3}$ общего объема, чтобы обеспечить интенсивное перемешивание. Для экстрагирования обычно используют смесь фильтрата культуральной жидкости и растворителя, взятых в равных объемах. Последовательное экстрагирование четырьмя одинаковыми порциями при использовании такого же количества растворителя способствует более эффективной экстракции.

Закрыв делительную воронку пробкой, правой рукой берут горлышко с пробкой, а левой — кран так, чтобы суженная часть конуса располагалась на уровне ладони, а пальцами можно было бы свободно поворачивать кран. Если держать ладони на уровне корпуса делительной воронки, то раствор может нагреться, упругость паров растворителя и давление в воронке увеличатся, в результате чего пробка и кран могут выскочить. Делительную воронку с фильтратом культуральной жидкости и растворителем поворачивают сливной трубкой кверху и осторожно приоткрывают кран. После сброса избыточного давления дают возможность жидкости, которая увлекается струей паров в сливную трубку, стечь обратно в воронку. Закрыв кран, воронку несколько раз встряхивают и снова открывают кран. Интенсивное встряхивание и выравнивание давления в делительной воронке с атмосферным повторяют несколько раз для достижения равновесия фаз. Укрепив делительную воронку на штативе, следует дождаться разделения фаз, после чего открывают пробку. Нижнюю фазу сливают через сливную трубку, верхнюю — через горлышко воронки. Если нижнюю фазу необходимо оставить в воронке, то верхнюю можно отсосать с помощью сифона, пипетки или шприца. Перед выпуском нижней фазы всегда нужно вынуть пробку.

Собранные экстракты подвергают концентрированию в пленочном или роторном испарителе. Для термостабильных фитотоксических веществ отгонку растворителей, особенно высококипящих, рекомендуется проводить в обычных приборах для концентрирования растворов в вакууме. Вакуум следует создавать водоструйным насосом.

ХIII.3. РАЗДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ФИТОТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Упариванием и экстракцией не удастся выделить вещество в чистом виде. Обычно получают смесь соединений, в лучшем случае с близкими физическими свойствами. Для разделения смеси на индивидуальные вещества чаще всего применяют следующие методы:

1. Последовательную обработку выделенной смеси различными растворителями.
2. Распределение веществ между двумя несмешивающимися растворителями.
3. Хроматографию: а) на бумаге; б) на колонке; в) в тонком слое; г) газовую.
4. Кристаллизацию.

XIII.3.1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ВЫДЕЛЕННОЙ СМЕСИ РАЗЛИЧНЫМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ [250]

Смесь веществ, полученную простым упариванием экстракта, предварительно разделяют на фракции и очищают от примесей. Для этого ее последовательно обрабатывают разными растворителями. Необходимость и очередность обработки зависят от природы разделяемых веществ. Если нужно освободиться от липидных и смолистых веществ, то препарат обрабатывают петролейным эфиром или ацетоном. Водорастворимые фитотоксические вещества рекомендуется последовательно обработать четыреххлористым углеродом, хлороформом, этилацетатом для удаления сопутствующих органических веществ. Нерастворимые фитотоксические вещества следует обработать водой для удаления минеральных примесей, а также, по необходимости, метиловым или этиловым спиртом.

Экстракты в растворителях, не смешивающихся с водой, целесообразно разделять на нейтральную, кислую и фенольную фракции. Для этого разбавленный раствор экстрактивных веществ помещают в делительную воронку, туда же приливают 5%-ный раствор бикарбоната натрия и взбалтывают. После расслаивания водный раствор отделяют и повторяют операцию с новой порцией бикарбоната натрия. Органические кислоты при этом переходят в натриевые соли, растворимые в воде. Если прилить к водному раствору разбавленную серную кислоту, то соли разлагаются и свободные органические кислоты можно отделить фильтрованием или с помощью органического растворителя (например, эфира). Экстракт, не содержащий кислот, затем обрабатывают 5%-ным раствором щелочи для отделения фенольных соединений. Из экстракта, освобожденного от кислот и фенолов, отгоняют полностью или частично растворитель, после чего остаются нейтральные продукты.

XIII.3.2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ МЕЖДУ ДВУМЯ НЕСМЕШИВАЮЩИМИСЯ РАСТВОРИТЕЛЯМИ [98]

Более или менее чистые вещества из смесей можно получить распределением их в двух несмешивающихся растворителях. При удачном подборе жидкостей примеси оказываются в одном слое, а нужное вещество — в другом. Применяются, например, такие пары растворителей: петролейный эфир — 85%-ный спирт, бензол — водный раствор ацетона. Неполярный растворитель обогащается при этом углеводородами, простыми эфирами и подобными веществами. Спирты, карбонильные соединения, кислоты переходят в полярный растворитель. Затем из каждого слоя отгоняют растворитель, а остаток кристаллизуют или хроматографируют. Описанный прием позволяет осуществить только групповое разделение веществ.

XIII.3.3. ХРОМАТОГРАФИЯ

XIII.3.3.1. ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ [66, 248, 297, 381, 462]

Препаративная хроматография на бумаге имеет некоторые преимущества перед другими методами: легкость подбора условий для разделения, очень простой переход от аналитических опытов к препаративным, возможность работать с минимальными количествами вещества, простота методики. Теми же достоинствами обладает и хроматография в тонком слое адсорбента, однако бумажная хроматография удобнее при работе с фитотоксинами, так как с помощью биоавтографического метода фитотоксические вещества проще выявлять на бумаге, чем на тонкослойной пластинке. Хотя методом препаративной бумажной хроматографии можно получить лишь несколько десятков миллиграммов образца, для первичного обследования веществ (например, для снятия УФ- и ИК-спектров) такого количества бывает обычно достаточно.

Техника выполнения бумажной хроматографии описана в разделе X.3.6.

XIII.3.3.2. ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ [248, 381]

Метод эффективен и удобен для разделения смесей, очистки и идентификации веществ.

Колонка представляет собой трубку с краном в нижней части. Диаметр трубки 1,5—3,0 см, высота 20—40 см, слой сорбента 10—25 см, свободное пространство над сорбентом 10—15 см. Заполнение трубки пористым материалом является важной операцией при подготовке колонки к работе. Применяющиеся в хроматографии пористые материалы (активированный уголь, силикагель, активированная окись алюминия и т. д.) представляют собой чаще всего порошкообразные вещества различной дисперсности. Техника наполнения трубки адсорбентом или носителем до настоящего времени остается наименее разработанным и наименее совершенным этапом при подготовке хроматографического опыта.

Трубку можно заполнять порошкообразным материалом в сухом виде или в виде суспензии в какой-либо жидкости. В первом случае порошок всыпают в трубку небольшими порциями и уплотняют, постукивая колонкой твердую поверхность. Можно пользоваться также стеклянным или деревянным пестиком, подобранным по диаметру колонки. Многие применяемые в хроматографическом анализе адсорбенты и носители способны набухать, поэтому адсорбент предварительно суспендируют в течение 1—2 сут в растворителе, а затем вносят в колонки.

В заполненную адсорбентом колонку вносят вещество и элюируют его. Растворитель для элюирования подбирают на основании данных суммарной хроматографии. Собирают большое количество фракций. Чем больше фракций, тем точнее разделение. По мере того как один растворитель перестает вымывать заметное количество вещества, его заменяют другим. Нейтральные соединения рекомендуется последовательно элюировать петролейным эфиром, бензолом, эфиром, спиртом. Иногда применяют смеси растворителей, например петролейный эфир — бензол в соотношении 1 : 1. Чтобы получить вещество в чистом виде, его перекристаллизовывают или перегоняют.

ТСХ позволяет быстро идентифицировать вещества, контролировать ход реакций, наблюдать за процессом разделения сложных смесей и подбирать оптимальные условия хроматографирования на колонках. В качестве сорбентов для разделения фитотоксических веществ используют силикагель марки КСК, очищенный от примесей солей тяжелых металлов (главным образом железа). Для этого размолотый на кофейной мельнице силикагель заливают концентрированной HCl (1 : 1) и оставляют на сутки. Соляная кислота, растворяя примеси, приобретает желтую окраску. Ее удаляют декантацией или отсасывают на стеклянном фильтре № 1, а силикагель заливают новой порцией чистой HCl . Эту операцию повторяют несколько раз (7—8) до тех пор, пока соляная кислота не перестанет окрашиваться. Силикагель отмывают от HCl бидистиллированной водой до отрицательной пробы на ионы Cl^- (по AgNO_3). Затем гель дважды обрабатывают ледяной уксусной кислотой, промывают бидистиллированной водой (2—3 раза), затем 0,02 н. раствором NH_4OH и, наконец, тщательно промывают бидистиллированной водой (до нейтральной реакции фильтрата). Затем следует двукратная обработка кипящим метанолом (под тягой! температура кипения метанола $64,7^\circ \text{C}$). Отмытый таким образом силикагель подсушивают на воздухе (под тягой!) до исчезновения запаха метанола, затем выдерживают в течение 1 ч в термостате при температуре 110°C , просеивают через сито с размером пор 0,25 мм. Готовый для работы силикагель хранят в эксикаторе над прокаленным хлористым кальцием.

Для приготовления тонкого закрепленного слоя сорбента к силикагелю добавляют специально приготовленный гипс ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Препарат гипса квалификации «ч» готовят, добавляя к отфильтрованному теплomu раствору $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ («ч»; 20 г в 250 мл воды) раствор CaCl_2 («ч»; 50 г в 200 мл воды) и проверяют на полноту осаждения (добавление CaCl_2 в отфильтрованный раствор не должно вызывать образования осадка). Осадку дают отстояться, промывают 5—6 раз водой, отсасывают осадок гипса и промывают до полного удаления NH_4^+ (проба реактивом Несслера). Осадок гипса промывают спиртом и сушат при $103\text{—}105^\circ \text{C}$ в течение 2 ч, а затем при $98\text{—}100^\circ \text{C}$ в течение 4 ч.

Сорбент готовят смешиванием 30 г силикагеля и 10 г гипса с добавлением 60 мл бидистиллированной воды. Смесью растирают в ступке и энергично встряхивают в колбе с притертой пробкой.

Полоски стекла размером 15×3 см (тщательно вымытые содой, хромовой смесью, водой) покрывают слоем жидкого сорбента (по 3 мл на пластинку; пользуются маленьким цилиндром или мерной пробиркой). Суспензию сорбента равномерно распределяют по всей поверхности стекла. Пластинки помещают на горизонтальный столик, подсушивают на воздухе около 30 мин, затем помещают в термостат для активации на 15—30 мин при $110\text{—}120^\circ \text{C}$. Активированные пластинки охлаждают 10 мин в эксикаторе над прокаленным хлористым кальцием.

На пластинку со слоем сорбента микропипеткой наносят 0,2 мл раствора. Фитотоксические вещества наносят на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки. Чтобы не повредить слой сорбента, раствор фитотоксических веществ наносят небольшими каплями, не касаясь кончиком пипетки поверхности сорбента. Линию нанесения периодически подсушивают струей воздуха. После нанесения необходимого количества фитотоксических веществ пластинки подсушивают воздухом и ставят под

небольшим углом в хроматографическую камеру. За 10 мин до разгонки в камеру наливают 30 мл смеси растворителей. Разделение фитотоксических веществ продолжается 30—40 мин.

XIII.3.3.4. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ [45, 250]

В последние годы все большее значение в изучении сложных природных смесей приобретает газовая хроматография. В основе газовой хроматографии лежат законы распределения вещества между двумя фазами, одна из которых подвижна. Известно несколько вариантов газовой хроматографии. Однако во всех случаях через слой неподвижной фазы непрерывным потоком проходит газ (подвижная фаза), который несет анализируемые вещества. Различают газо-адсорбционную и газо-жидкостную хроматографию. В газо-адсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы используют твердые активные адсорбенты (уголь, силикагель, молекулярные сита и т. п.). В газо-жидкостной хроматографии роль неподвижной фазы выполняют жидкости (динонилфталат, дипропионитриловый эфир, парафиновое масло и др.), нанесенные на инертное твердое тело.

Метод заключается в многократном распределении паров между движущимся с определенной скоростью газом (10—100 мл/мин) и твердым адсорбентом или жидкостью, заключенными в колонку. В зависимости от сродства к неподвижной фазе вещества в той или иной степени удерживаются ею и появляются на выходе из аппарата отдельными фракциями. Автоматическое устройство фиксирует эти вещества по их физическим или химическим свойствам (плотности, теплопроводности и т. п.), а самописец регистрирует количество фракций или концентрацию веществ в газе — носителе. Метод отличается чрезвычайной эффективностью. Он точен и требует небольшого количества вещества (несколько миллиграммов).

XIII.3.4. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ [98]

При охлаждении насыщенного раствора из него выделяется растворенное вещество в виде кристаллов. Кристаллизацию проводят следующим образом.

Колбу определенного размера закрывают пробкой, в которую вставлена трубка длиной не менее 75 см. Эта трубка служит холодильником. Взвесив кристаллизуемое вещество, примерно половину его высыпают в колбу с холодильной трубкой. Определенное количество (по объему) растворителя приливают небольшими порциями в колбу и после прибавления каждой порции содержимое колбы нагревают до кипения. Так поступают до тех пор, пока все находящееся в колбе вещество не перейдет в раствор. Следует помнить, что кристаллизуемое вещество может содержать примеси, не растворимые в данном растворителе. Поэтому, когда основная масса вещества растворится, оценивают на глаз, какая часть его осталась нерастворенной. Зная объем взятого растворителя, добавляют в колбу количество его, пропорциональное нерастворенному осадку. Если последний при этом не перейдет в раствор, можно считать его посторонней примесью, которая должна быть отделена при фильтровании. Если же при прибавлении растворителя весь осадок перейдет в раствор, небольшими порциями добавляют в колбу оставшееся вещество до тех пор, пока при нагревании не будет оставаться небольшой нерастворяющийся остаток. Этот остаток растворяют при дальней-

шем нагревании и добавляют снова соответствующее количество растворителя. Можно считать приготовленный таким образом горячий раствор насыщенным. Взвешивают оставшееся вещество, измеряют объем оставшегося растворителя и по разности масс и объемов определяют количество растворителя, необходимое для растворения всего взятого вещества. Всыпают оставшееся количество последнего в колбу, прибавляют соответствующее количество растворителя и кипятят до растворения вещества. После охлаждения раствора и выпадения кристаллов их отфильтровывают, отжимают и сушат.

Для более тщательной очистки перекристаллизацию приходится проводить несколько раз. С каждой новой перекристаллизацией количество вещества уменьшается, так как потери при кристаллизации неизбежны, как бы тщательно она не велась.

ХIII.4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Для установления подлинности веществ (идентификации) изучают их физико-химические свойства, постоянство которых является критерием чистоты и индивидуальности. Твердые вещества характеризуются прежде всего температурой плавления и растворимостью. Однако в исследовательских работах по идентификации веществ обязательно проводят качественный и количественный анализ на углерод, водород и азот [124, 468], определяют молекулярную массу, а также спектры поглощения веществ в УФ- и ИК-областях спектра.

ХIII.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ПО КОФЛЕРУ [124, 250]

Преимущество этого метода заключается в том, что для определения достаточно одного кристалла. Вещество помещают на предметное стекло, осторожно придавливают покровным и устанавливают на столике обычного микроскопа, снабженного термометром и приспособлением для равномерного и регулируемого обогрева. Наблюдая за моментом деформации одного-двух хорошо ограненных кристаллов, определяют температуру плавления с точностью до десятых долей градуса.

Для доказательства подлинности веществ важное значение имеет определение температуры плавления так называемой пробы смешения. В этом случае кристалл испытуемого вещества тщательно растирают на предметном стекле маленьким шпателем с кристаллом заведомо известного вещества и затем определяют температуру плавления. Если она не отличается от температуры плавления известного вещества, т. е. не дает депрессии, то идентичность считается установленной.

ХIII.4.2. ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ АНАЛИЗ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

ХIII.4.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕРОДА И ВОДОРОДА [468]

Для качественного обнаружения углерода и водорода несколько миллиграммов вещества накаливают в тугоплавкой пробирке с окисью меди. Органическое вещество разрушается при этом до двуокиси углерода и воды. Выделяющуюся двуокись углерода пропускают в баритовую или

известковую воду, благодаря чему образуется белый осадок соответствующей углекислой соли. Появление капель воды на стенках верхней холодной части пробирки служит доказательством наличия водорода в исследуемом веществе.

Классическим методом количественного микроаналитического определения углерода и водорода является метод Прегля: пары вещества окисляют, пропуская их в смеси с кислородом через нагретый до 750°C слой окиси меди и хромата свинца, помещенный в трубку для сжигания. Двуокись углерода и воду улавливают с помощью поглотительных аппаратов и определяют весовым способом. Продукты окисления других элементов адсорбируются находящимися в трубке для сжигания поглотителями (серебро или двуокись свинца).

XIII.4.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА [124, 468]

Для выявления азота органическое вещество разрушают, прокаливая его с металлическим калием. При наличии азота образуется цианистый калий, который действием серноокислой закиси железа и хлорного железа переводят в берлинскую лазурь (проба Лассеня). Эта проба неприменима при одновременном присутствии азота и серы, так как вместо цианида может образоваться роданистый калий.

Количественное микроаналитическое определение азота проводят методом Дюма: фитотоксическое вещество, содержащее азот, сжигается за счет кислорода раскаленной окиси меди в трубке, наполненной двуокисью углерода. При этом углерод окисляется в двуокись углерода, водород в воду, а весь содержащийся в веществе азот выделяется в виде элементарного азота, который количественно вытесняется углекислым газом в азотомер с раствором едкого натра или калия. Углекислота поглощается щелочью, а газообразный азот собирается в верхней, градуированной части азотомера (обычно емкостью 2 мл с градуировкой до 0,01 мл), где измеряется его объем. После приведения полученного объема газа к нормальным условиям вычисляют процентное содержание азота в веществе.

XIII.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ [124]

Для определения молекулярной массы чаще всего применяют криоскопический метод (по понижению температуры замерзания раствора). При этом необходимо пользоваться особо чувствительным термометром Бекмана, измеряющим температуру с точностью не менее $0,005^{\circ}\text{C}$. Молекулярную массу определяют по формуле $M = 100 pA/P\Delta t$, где p — навеска исследуемого вещества; A — молярное понижение температуры замерзания, т. е. такое, которое наблюдается при растворении 1 моля вещества в 1000 г растворителя; P — масса растворителя; Δt — понижение температуры замерзания.

XIII.4.4. МЕТОДЫ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА [31, 77, 313, 619]

Для идентификации фитотоксических веществ применимы электронные спектры поглощения в УФ и видимой областях от 200 до 1000 нм и колебательные спектры в ИК-области от 400 до 4000 см^{-1} . Электронные

спектры поглощения в УФ-области служат для групповой характеристики веществ с ненасыщенными связями или с другими хромофорами. График зависимости интенсивности поглощения от длины волны имеет вид кривой с максимумами и минимумами, характерными для определенных хромофорных групп. Однако максимумы могут смещаться в область длинных или коротких волн под влиянием других функциональных групп, находящихся в молекуле вещества. Тем не менее близкое приближение вида кривой к электрофореграммам известных веществ позволяет идентифицировать вещество. Если снимают спектр поглощения группы родственных веществ одного класса, различающихся лишь числом и характером хромофорных групп, то идентифицировать их можно более строго.

Идентификация с помощью УФ-спектроскопии ненадежна в тех случаях, когда кривая поглощения имеет размытые максимумы. Такие кривые не отражают специфики вещества, а максимум является суммарным отражением нескольких хромофоров или свидетельствует о смеси веществ.

Электронная спектроскопия позволяет идентифицировать также и окрашенные соединения, т. е. вещества, имеющие характерные максимумы поглощения в видимой области спектра.

Важное значение для идентификации фитотоксинов имеют методы ИК-спектроскопии, которые отличаются от электронной спектроскопии большей сложностью. По ИК-спектру можно проследить за любыми, даже незначительными взаимодействиями между атомами в молекулах, поэтому совпадение кривых данных спектров является самым убедительным доказательством идентичности веществ. При снятии спектров фитотоксических веществ обычно пользуются взвесью вещества в вазелиновом масле или в таблетках бромистого калия.

Идентификацию веществ с помощью ИК-спектроскопии осуществляют двумя способами: 1) сравнением спектра анализируемого соединения со спектрами веществ определенного класса непосредственно или по каталогу спектров; 2) определением функциональных групп по характеристическим полосам поглощения. В ряде случаев можно однозначно идентифицировать вещества при сочетании ИК- и УФ-спектров. Преимуществом спектральных методов является незначительное количество вещества (5—10 мг), требуемое для анализа.

XIV. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИКИ ГРИБОВ

XIV.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Гибридологический и мутационный анализы являются, как известно, основными методами генетических исследований. При работе с грибами эти методы имеют исключительно высокую разрешающую способность, что связано с биологическими особенностями грибов. Многие виды легко культивируются на питательных средах и за короткий промежуток времени воспроизводят большое число генераций. В жизненном цикле некоторых грибов имеется половой процесс, что позволяет осуществлять гибридизацию, а в потомстве анализировать непосредственно продукты мейоза. Для видов, лишенных полового процесса, разработаны методы анализа митотической рекомбинации. У грибов можно относительно легко индуцировать мутагенными факторами самые разнообразные морфологические, биохимические и физиологические мутанты. Таким образом, грибы, являясь типичными эукариотическими организмами, обладают в методическом отношении значительными преимуществами перед высшими растениями. Они исключительно удобный объект для изучения теоретических и прикладных проблем генетики.

В настоящее время генетические исследования проводят с представителями разных классов грибов и вполне естественно, что каждый объект требует определенного методического подхода. Ввиду большого разнообразия морфологического строения грибов, способов их размножения и питания, часто приходится модифицировать тот или иной метод применительно к каждому объекту исследований или разрабатывать новые методики. Ниже изложены лишь общие методические подходы к изучению генетики грибов. Более конкретные сведения можно получить из журнальных статей и из, к сожалению, немногочисленных специальных руководств [172, 406].

XIV.2. МЕТОДЫ МУТАЦИОННОГО АНАЛИЗА

Мутационный процесс может быть охарактеризован спектром мутантов и частотой возникновения спонтанных и индуцированных мутаций. По фенотипическому проявлению спектр мутантов условно подразделяют на *морфологический*, *биохимический* и *физиологический*. Морфологические мутанты различаются по размерам, форме, цвету и консистенции колоний, строению и окраске мицелия и другим признакам. Биохимические, или ауксотрофные, отличаются от исходных штаммов отсутствием способности синтезировать определенные аминокислоты, витамины

или азотистые основания. Физиологические мутанты отличаются чувствительностью к химическим и физическим факторам среды, способностью поражать устойчивые к исходным штаммам сорта растений, активностью ферментов.

Спонтанные мутации возникают редко, и выделение спонтанных мутантов — процесс чрезвычайно длительный и трудоемкий. Для увеличения частоты появления мутаций используют различные мутагенные факторы. В качестве мутагенов наиболее часто применяют УФ-, рентгеновские и гамма-лучи и химические вещества: азотистую кислоту, алкилирующие соединения, аналоги оснований и др. Механизмы мутагенного действия перечисленных факторов и природа вызываемых ими первичных повреждений ДНК достаточно хорошо изучены [173, 189, 416]. Рассмотрим наиболее важные приемы, которыми необходимо овладеть при работе с мутагенами.

XIV.2.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ГРИБОВ

Обработке обычно подвергают многоклеточную суспензию конидий гриба в дистиллированной воде или буфере. При наличии у грибов воздушного мицелия необходимо отделить его от спор, что достигается фильтрацией. В зависимости от размеров клеток можно пользоваться ватными, бумажными или марлевыми фильтрами, центрифугированием и т. д. Суспензии дрожжевых и дрожжеподобных грибов получают простым смывом клеток с поверхности питательной среды. В камере Горяева подсчитывают число клеток в 1 мл и при необходимости делают разведение суспензии до 10^6 — 10^9 клеток/мл.

XIV.2.2. ОБРАБОТКА МУТАГЕНОМ И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ДОЗ ДЛЯ ИНДУКЦИИ МУТАНТОВ

Суспензию во время обработки мутагеном тщательно перемешивают магнитной мешалкой или другими способами. При обработке УФ-лучами необходимо соблюдать меры предосторожности во избежание фотоактивации. Для получения кривых доза — эффект обычно используют не менее трех доз, экспозиций или концентраций мутагена, дающих выживаемость 50, 10 и 1% соответственно. При этом за 100% принимают выживаемость клеток в контроле, т. е. в необработанной мутагеном суспензии. Мутанты чаще всего отбирают среди 1% выживших клеток. Однако максимальный выход мутантов может наблюдаться в самом различном диапазоне доз, например при 30—50%-ной выживаемости клеток. В связи с этим необходим предварительный подбор оптимального уровня частоты мутаций.

Частота появления мутантов различна у разных видов и штаммов грибов, зависит также от выбора мутации, по которой ведется учет, мутагена, системы отбора мутантов и прочих причин. Поэтому, приступая к серийным опытам, целесообразно провести предварительные эксперименты по подбору оптимальных доз или концентраций мутагена применительно к используемым штаммам гриба, питательным средам или сортам растений.

XIV.2.3. ПОСЕВ ОБРАБОТАННОЙ МУТАГЕНОМ СУСПЕНЗИИ

После обработки мутагеном суспензию высевают на питательную среду в таких разведениях, чтобы число выросших колоний было по возможности одинаковым независимо от увеличения дозы и не наблюдалось бы слияния колоний. При работе с мицелиальными формами, колонии которых разрастаются по всей чашке, необходимо вносить в питательную среду вещества, оказывающие параморфный эффект (натриевую соль дезоксихолиевой кислоты, свекловичный пектин, медицинскую желчь и др.). В исследованиях с фитопатогенными грибами приходится в некоторых случаях высевать обработанную мутагеном суспензию непосредственно на растение-хозяин. Известны лабораторные методы, позволяющие проводить рассев большой популяции клеток на изолированные листья растений [14, 310].

Листья проростков растений раскладывают в чашки Петри сплошным газоном и опрыскивают мерным количеством споровой суспензии определенной концентрации. В течение суток чашки экспонируют на рассеянном свете. Затем на дно чашек наливают 10—15 мл 0,004%-ного раствора бензимидазола, что поддерживает метаболизм в тканях листьев, сохраняя их зелеными. После этого чашки помещают в установку, оснащенную лампами дневного света с интенсивностью освещения около 3000 лк. Этот метод особенно удобен для генетического изучения облигатных паразитов и для тестирования клонов по признаку вирулентности. Таким образом, представляется возможным непосредственно на листьях растений учитывать летальное и мутагенное действие различных факторов и проводить отбор мутантов. Следует при этом иметь в виду, что данные по выживаемости и частоте мутаций на листьях растений могут отличаться от данных, получаемых на агаровых питательных средах.

XIV.2.4. ОТБОР МОРФОЛОГИЧЕСКИХ МУТАНТОВ

Выявление мутантов с измененной морфологией колоний, конидиеносцев или конидий не представляет особых трудностей. Внешние различия в морфологии колоний легко обнаружить невооруженным глазом, а для более тонких исследований можно воспользоваться микроскопом. Все выросшие колонии просматривают и выделяют резко отличающиеся от исходного типа. Для многих видов характерно появление колоний с измененным цветом или выделяющих в среду пигмент, интенсивно спороносящих или аспорогенных, складчатых или морщинистых.

XIV.2.5. ОТБОР БИОХИМИЧЕСКИХ МУТАНТОВ

Принцип отбора биохимических мутантов заключается в том, что в силу нарушения синтеза какого-либо компонента внутриклеточного обмена мутанты не могут расти на среде, не содержащей этого компонента. В отличие от них клетки дикого типа (прототрофы) размножаются без дополнительного фактора роста. Исходя из этого суспензию клеток, обработанных мутагеном, высевают на питательную среду, обогащенную аминокислотами, витаминами и азотистыми основаниями (среда полного состава). Для выделения ауксотрофных мутантов колонии, выросшие на среде полного состава, необходимо перенести на среду мини-

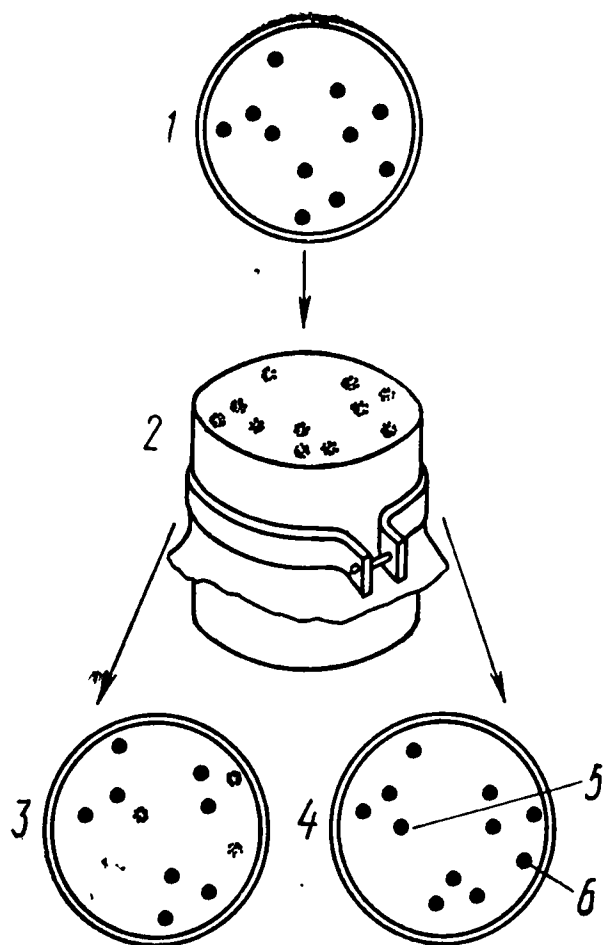


Рис. 116. Отбор ауксотрофных мутантов методом отпечатков:

1 — колонии на полной среде; 2 — отпечаток колоний на бархате; 3, 4 — отпечатки колоний с бархата на минимальную и полную среды; 5, 6 — ауксотрофные мутанты.

мального состава, т. е. не содержащую факторов роста. Колонии, не растущие на минимальной питательной среде, считаются ауксотрофными мутантами.

Перенос колоний с одной среды на другую можно осуществить методом отпечатков. Для этого к поверхности колоний, выросших на полной питательной среде в чашках Петри, прикладывают стерильный бархат, а затем этот же бархат прикладывают к поверхности минимальной или иной тестерной среды в другой чашке Петри (рис. 116). При работе с грибами, образующими воздушный мицелий, пользуются спе-

циальными репликаторами [834]. В связи с отсутствием в минимальной среде аминокислот, витаминов и азотистых оснований, клетки, не способные самостоятельно синтезировать эти вещества, т. е. ауксотрофные мутанты, не размножаются. Идентичные им колонии выделяют со среды полного состава и после повторной проверки на ауксотрофность идентифицируют на установление специфической потребности в ростовом факторе. Известны и другие методики отбора ауксотрофных мутантов: использование антибиотиков, задерживающих рост прототрофных клеток, метод замедленного обогащения среды и др. [3, 78].

ХIV.2.6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ

Обычно ауксотрофные мутанты идентифицируют по потребности в аминокислотах, витаминах и азотистых основаниях. Аминокислоты и азотистые основания добавляют в минимальную среду в количестве

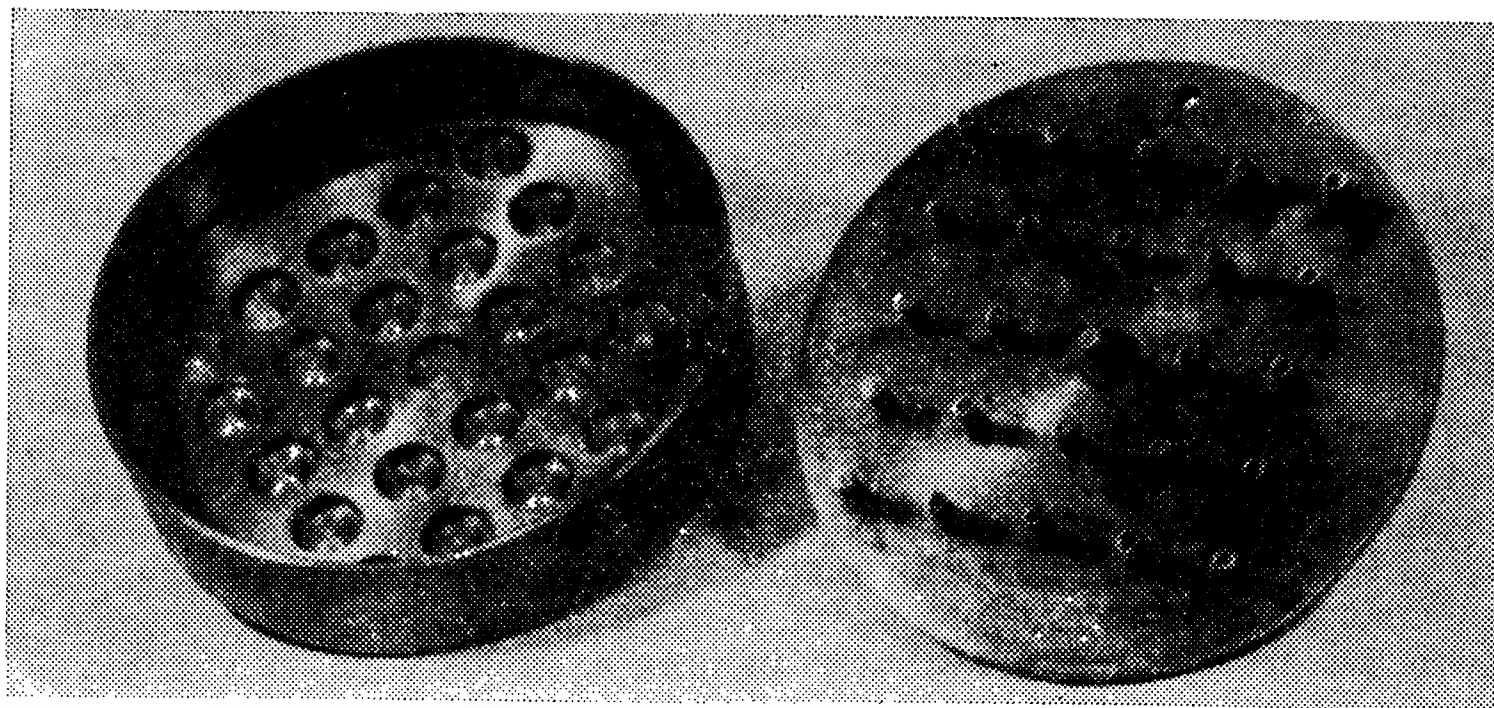


Рис. 117. Металлическая чашка с репликатором для идентификации ауксотрофных мутантов.

Т а б л и ц а 26. Сочетание ростовых факторов для идентификации ауксотрофных мутантов

Номер чашки	Номер чашки					
	1	2	3	4	5	6
7	Аденин	Биотин	Фенил-аланин	Аланин	Аргинин	Лейцин
8	Гипо-ксантин	Фолиевая кислота	Серин	Цистеин	Орнитин	Глицин
9	Цитозин	Пантотено-вая кислота	Триптофан	Треонин	Аспара-гиновая кислота	Изолей-цин
10	Гуанин	Пиридоксин	Тирозин	Тио-сульфат	Пролин	Гистидин
11	Тимин	Тиамин	Параамино-бензойная кислота	Метио-нин	Глутами-новая кислота	Лизин
12	Тиамин	Рибофлавин	Никотино-вая кислота	Холин	Инозит	Валин

10, витамины — 1 мкг/мл среды. Методические подходы к определению пищевых потребностей могут быть различными. Один из них состоит в высеве мутантов на минимальную среду, в которую внесена целая группа аминокислот либо витаминов, или азотистых оснований. Затем, установив в какой из этих групп присутствует фактор роста, необходимый мутанту, проводят более детальную идентификацию к каждому веществу этой группы.

Метод быстрой идентификации ауксотрофных мутантов предложен Р. Холлидеем [622]. В 12 чашек Петри с минимальной средой добавляют по шесть ростовых факторов в определенных сочетаниях (табл. 26). После засева среды ауксотрофными мутантами оценивают их пищевые потребности с помощью таблицы. Например, мутант с потребностью в аденине будет расти в 1-й и 7-й чашках, рост метионинзависимого мутанта проявится в 4-й и 11-й чашках. Известны модификации этого метода, различающиеся, в основном, сочетанием ростовых факторов [242]. Однако метод Холлидея следовало бы использовать лишь для первичной оценки потребностей ауксотрофов, так как не всегда удастся определить истинную потребность мутанта в ростовом факторе из-за наличия комплекса веществ в одной чашке. Поэтому приходится дополнительно проверять ауксострофы посевом на минимальную питательную среду, ограниченную одним веществом.

Для быстрого определения питательных потребностей большого числа мутантов пользуются металлической чашкой с лунками и репликатором с таким же количеством штырьков (рис. 117). В каждой лунке простерилизованной чашки готовится суспензия мутанта. Репликатор после стерилизации в спирте и над пламенем горелки охлаждают в отдельной чашке с минимальной средой и опускают в гнезда металлической чашки. Затем репликатор поднимают и капли суспензии переносят на тестерные среды. Рост мутанта на минимальной среде с добавкой ростового фактора указывает на его потребность именно в данном веществе.

XIV.2.7. ОТБОР ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МУТАНТОВ

Основной принцип отбора мутантов, устойчивых к токсическим веществам, или мутантов по признаку вирулентности, заключается в посеве большой популяции клеток на селективную питательную среду. Селектирующим агентом служит фактор, по отношению к которому нужно получить мутанты (фунгицид, антибиотик, сорт растения). Деление чувствительных к данному фактору клеток подавляется, а устойчивые клетки продолжают размножаться.

Выделение мутантов, устойчивых к токсическим веществам, следует начинать с определения концентрации, при которой выживают лишь отдельные клетки гриба. Для этого готовят твердую питательную среду с градиентом концентрации ингибитора. Способ приготовления заключается в следующем. Теплую агаровую среду выливают в чашки Петри и ставят ее наклонно, чтобы получился скошенный слой агара. После затвердения среды чашку устанавливают горизонтально и наливают второй слой агара вместе с токсическим веществом. В результате диффузии токсического вещества в нижний слой агара концентрация его становится пропорциональной толщине питательной среды. Получив линейный градиент концентрации ингибитора, засевают среду густой суспензией спор гриба. Колонии образуются неравномерно. В местах наиболее высокой концентрации ингибитора вырастают лишь единичные колонии, вероятно, клоны устойчивых мутантов. Их выделяют и пересевают на среды с более высокой концентрацией токсического вещества. Последовательно увеличивая концентрации ингибитора в питательной среде, можно отобрать мутанты с очень высоким уровнем устойчивости.

Отбор мутантов по признаку вирулентности проводят инокуляцией споровой суспензией гриба иммунных сортов растения-хозяина. Целесообразно использовать в работе штаммы, дополнительно маркированные по какому-либо признаку, например отличающиеся от исходного типа цветом спор. Возникновение на иммунном сорте симптомов поражения указывает на появление вирулентных мутантов.

Увеличение выхода физиологических мутантов можно индуцировать обработкой спор мутагенными факторами.

XIV.2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ПОЯВЛЕНИЯ МУТАНТОВ

Летальный и мутагенный эффект физических и химических факторов учитывают по выживаемости клеток грибов после обработки и количеству возникающих мутаций. На основании этих данных строят графики зависимости выживаемости и частоты мутаций от дозы мутагена. По оси абсцисс откладывают дозы или экспозиции воздействия мутагеном, а по оси ординат — логарифмы процента выживаемости и частоту мутаций (рис. 118).

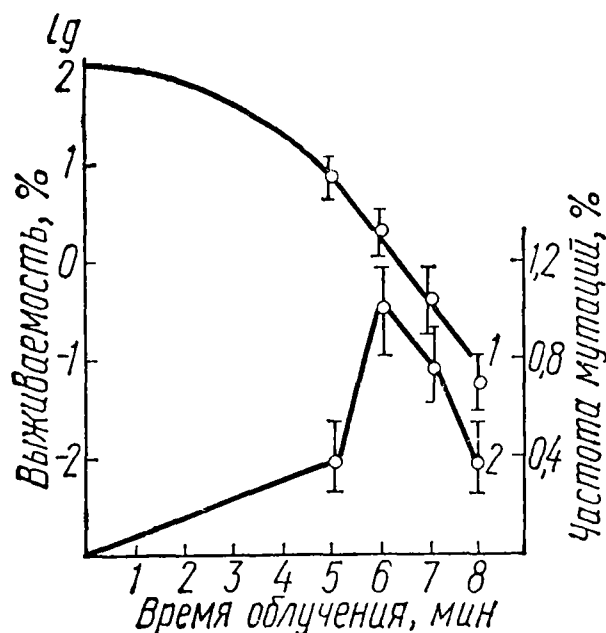


Рис. 118. Зависимость выживаемости конидий (1) и частоты появления морфологических мутантов (2) у *Pullularia pullulans* от дозы УФ-облучения; мощность дозы — 51 эрг/с на 1 мм².

Частоту появления морфологических мутантов рассчитывают по формуле $r = M/N$, где M — число мутантных колоний; N — общее число выросших колоний.

При учете мутаций на селективной среде частоту встречаемости мутантов определяют как отношение числа выросших на данной среде мутантных колоний (M) к общему числу колоний, выросших на неселективной среде (N) с учетом разведений исходной суспензии (p). Таким образом, частота мутаций определяется формулой $r = M / pN$.

Более подробно с методами учета концентрации мутантов в популяции и вероятности возникновения мутаций можно познакомиться в соответствующих руководствах по генетике микроорганизмов [171, 172].

XIV.3. МЕТОДЫ ГИБРИДОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В основе гибридологического анализа лежит получение гибридов и изучение характера расщепления в потомстве по какому-либо признаку. В результате представляется возможным выяснить закономерности наследования признака, детерминирован он ядром или цитоплазмой, определить число генов, контролирующих изучаемый признак, расположение их в хромосомах. Методы получения гибридов в значительной мере зависят от особенностей жизненных циклов, половой дифференциации и системы несовместимости у грибов. У гетероталлических видов половой процесс возможен только при взаимодействии клеток разного типа спаривания; клетки гомоталлических видов копулируют в любых комбинациях. Системы половой несовместимости у грибов весьма разнообразны [184]. Для фикомицетов, сумчатых и ржавчинных грибов характерна система несовместимости, контролируемая, в основном, одним локусом с двумя аллелями; головневые могут иметь один или два локуса с множественными аллелями, контролирующими половую несовместимость. Генетический анализ у грибов, в жизненном цикле которых отсутствует половой процесс, основывается на данных анализа митотической рекомбинации.

XIV.3.1. АНАЛИЗ ГИБРИДОВ ПРИ ПОЛОВОМ РАЗМНОЖЕНИИ

Для проведения гибридологического анализа грибов, в жизненном цикле которых известен половой процесс, необходимо получить гибриды, выделить из них гибридное потомство и проанализировать его расщепление. Учет расщепления основывается на данных тетрадного анализа или анализа случайной выборки гаплоидных клеток — продуктов мейоза.

XIV.3.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ

Наиболее простой метод получения гибридов заключается в совместном культивировании штаммов разного типа спаривания. При этом удобно использовать генетически маркированные линии, что позволяет легко отличить гибрид от родительских штаммов. Для некоторых видов (например, *Saccharomyces cerevisiae*) достаточно провести посев на агаровую питательную среду перекрещивающимися штрихами двух родительских штаммов, чтобы в короткий срок получить в месте перекреста

гибрид. У других видов методы получения гибридов сложнее, и осуществить гибридизацию можно на агаровых средах или на растительном материале. Так, для получения сумчатой стадии *Euglenophora teres* рекомендуется попарный посев штаммов положительного (+) и отрицательного (—) типов спаривания на синтетическую среду, содержащую в 1 л воды (г): 1 Ca (NO₃)₂; 0,25 K₂HPO₄; 0,25 MgSO₄; 4 CaCO₃; следы FeSO₄ и 20 агара. В среду вдавливают автоклавированные семена ячменя или сорго. Засеянные среды инкубируют в термостате при температуре 15° С и 16-часовом освещении. Перитеции с асками и аскоспорами образуются через 2,5 мес [694]. Сумчатую стадию этого гриба можно получить на стерильной соломе ячменя и на листьях лимона [259]. Стебли ячменя или листья лимона раскладывают на несколько слоев фильтровальной бумаги и автоклавируют. На их поверхность высевают штаммы разного типа спаривания и культивируют в тех же температурном и световом режимах до появления перитециев с асками. На стерильной соломе можно получить и сумчатую стадию грибов рода *Cochliobolus* [802].

Гибриды головневых грибов получают в два этапа: сначала гаплоидные штаммы разного типа спаривания выращивают на искусственной питательной среде, а затем их совмещают на растении-хозяине. На последнем образуется дикарион и формируются гибридные телиоспоры. У некоторых видов головневых грибов, например у *Ustilago maydis*, *U. hordei*, дикарион можно получить, совмещая штаммы разного типа спаривания на среде, содержащей 1% активированного угля [561, 563].

Гибриды у облигатно паразитирующих грибов, например возбудителей ржавчины злаков, получают непосредственно на растении. Если у возбудителя ржавчины имеется промежуточный хозяин, то базидиоспорами заражают его листья и получают спермогонии со спермациями положительного (+) и отрицательного (—) типов спаривания. После этого переносят спермации из одних спермогониев в другие (рис. 119). Слияние (+) спермациев с (—) воспринимающими гифами спермогония, или наоборот, приводит к образованию эцидий с дикариотическими эцидиоспорами. Последние заражают растение-хозяин, что приводит к появлению уредий с дикариотическими уредоспорами. На основном хозяине можно провести анализ дикариофазы. Эцидиоспоры и уредоспоры могут вызывать появление дикариотических телиоспор. Перед прорастанием два ядра в телиоспорах сливаются, что приводит к образованию гибридного диплоида.

XIV.3.1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГИБРИДНОГО ПОТОМСТВА

Наиболее простой способ выделения гибридного потомства — тотальная изоляция гаплоидных продуктов мейоза. В этом случае дальнейшему анализу подвергается случайная выборка спор. У некоторых аскомицетов при созревании асков аскоспоры «выстреливаются» из плодовых тел. Аскоспоры собирают, накрывая перитеции чашкой с агаровой средой. Можно, выделив перитеций, удалить прилипшие к нему конидии и гифы, а затем раздавить плодовое тело стеклянной палочкой и освободившиеся аскоспоры рассеять. Применительно к дрожжевым грибам разработаны способы, позволяющие относительно просто отделять аскоспоры от вегетативных клеток и выделять их из сумок. В частности, клетки спорулирующей культуры дрожжей-сахаромицетов помещают в раствор спирта такой концентрации, при которой вегетативные клетки гибнут, а аски с аскоспорами остаются жизнеспособными. Далее суспензию центрифугируют, осадок промывают дистиллированной стерильной водой и помещают в раствор пищеварительного сока ули-

ток рода *Helix*. Пищеварительный сок содержит ферменты, растворяющие оболочки асков и оставшихся жизнеспособными вегетативных клеток, в результате чего последние гибнут, а аскоспоры высвобождаются из асков. В некоторых случаях вегетативные клетки оказываются столь чувствительными к действию пищеварительного сока улиток, что предварительная обработка спиртом необязательна.

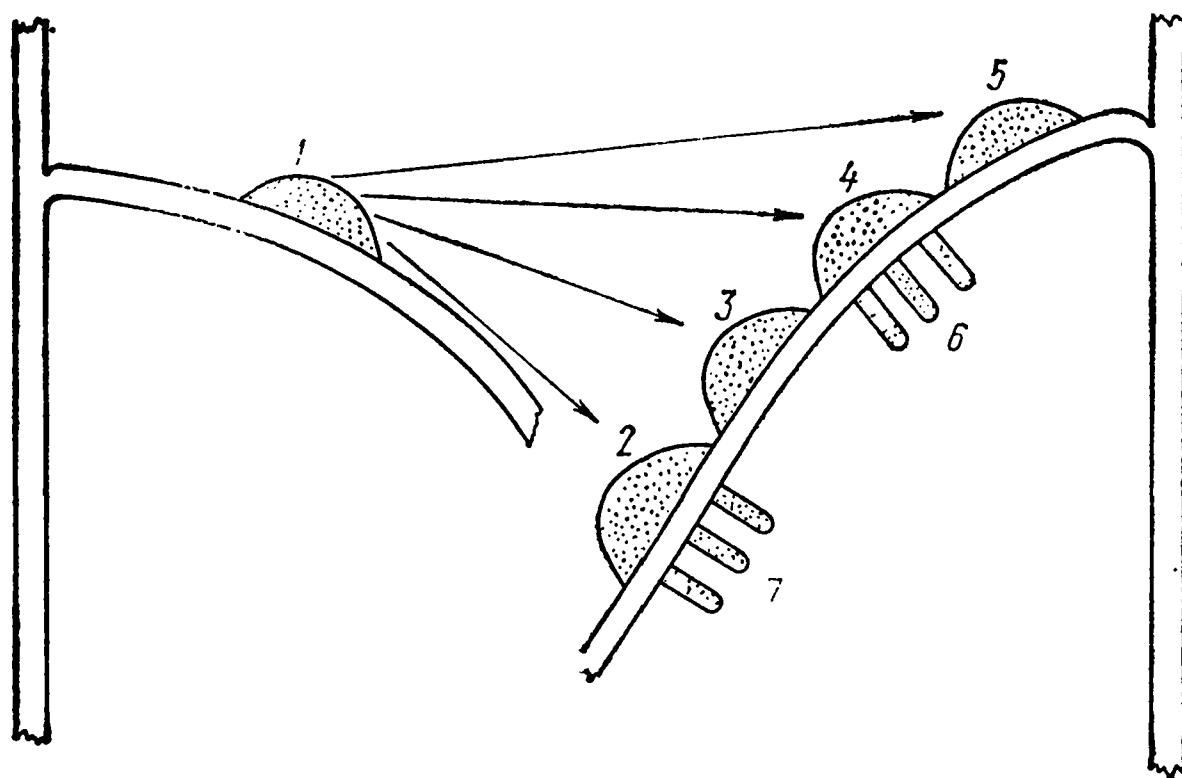


Рис. 119. Схема гибридной ржавчины пшеницы. Перенос сперматозоидов из спермогонии 1 в эцидии 2—5; 6, 7 — эцидии.

При необходимости более детального генетического анализа выделение гибридного потомства проводят в порядке расположения гаплоидных продуктов мейоза в сумках аскомицетов или на промицелии базидиальных грибов. С помощью микроманипулятора изолируют споры из отдельных тетрад и помещают их на питательную среду. По сравнению с анализом случайной выборки спор такой тетрадный анализ имеет большую разрешающую способность.

ХИВ.3.1.3. АНАЛИЗ РАСЩЕПЛЕНИЯ В ПОТОМСТВЕ ГИБРИДОВ

Анализ расщепления в случайной выборке спор не отличается от генетического анализа, проводимого у высших растений при анализирующих скрещиваниях. Диплоид Aa , полученный от скрещивания гаплоидов, различающихся по одному альтернативному признаку A и a , расщепляется в потомстве в соотношении $1 : 1$ ($2A : 2a$ у базидиомицетов и некоторых аскомицетов, $4A : 4a$ у большинства аскомицетов). Это следует из закономерности расхождения гомологичных хромосом в мейозе, вместе с которыми распределяются аллели гена, контролирующего данный признак. Если обнаруживается закономерное отклонение от соотношения $1 : 1$, можно предположить, что изучаемый признак определяется не одним, а несколькими генами. Отсутствие расщепления указывает на возможность контроля со стороны цитоплазматических наследственных факторов.

Потомство гибрида $AaBb$, полученного от скрещивания гаплоидов, различающихся по двум признакам, контролируемым двумя парами аллелей A и a , B и b , должно расщепляться в соотношении $1 : 1 : 1 : 1$.

Отклонение от этого соотношения указывает на сцепление генов или их взаимодействие по типу полимерии, эпистаза и т. д.

Тетрадный анализ позволяет установить количество групп сцеплений (хромосом), локализацию в них генов, выявить расстояние между генами и центромерой, ориентацию генов относительно друг друга и центромеры. При тетрадном анализе учитывается расщепление в каждой тетраде гаплсидных продуктов мейоза. Рассмотрим проведение тетрадного анализа на примере аскомицета *Venturia inaequalis*.

Известно, что при образовании аскоспор диплоидное ядро *V. inaequalis* претерпевает два мейотических и два митотических деления, в результате которых формируется сумка с 8 двужядерными аскоспорами. Поэтому если родительские штаммы отличались по одному признаку, контролируемому двумя аллелями одного гена (*A* и *a*), то в результате первого мейотического деления образуется 2 ядра — одно с аллелью *A* и второе с аллелью *a*. После второго мейотического деления, когда хроматиды расходятся по разным ядрам, возникают 4 ядра с аллелями *A*, *A*, *a*, *a*. При первом митотическом делении возникают 8 аскоспор генотипа *A*, *A*, *A*, *A*, *a*, *a*, *a*, *a*. Второе митотическое деление приводит к появлению двужядерных аскоспор генотипа *A*, *A*; *A*, *A*; *A*, *A*; *A*, *A*; *a*, *a*; *a*, *a*; *a*, *a*; *a*, *a*. Таким образом, для любого гена в аске должно наблюдаться расщепление $4A : 4a$, или $1 : 1$. Однако в экспериментах встречаются и другие комбинации расположения аскоспор. Например, наряду с указанным типом расположения аскоспор (для простоты двужядерные аскоспоры будем обозначать одной буквой) *A*, *A*, *A*, *A*, *a*, *a*, *a*, *a* или *a*, *a*, *a*, *a*, *A*, *A*, *A*, *A* могут встречаться сумки с аскоспорами генотипа *A*, *A*, *a*, *a*, *A*, *A*, *a*, *a* или *a*, *a*, *A*, *A*, *a*, *a*, *A*, *A*; *A*, *A*, *a*, *a*, *a*, *a*, *A*, *A*, или *a*, *a*, *A*, *A*, *A*, *A*, *a*, *a*. Последние четыре комбинации должны ожидать в случае кроссинговера на участке между геном и центромерой. По частоте появления таких асков можно судить о частоте рекомбинаций между геном и центромерой и определить их взаимное расположение в хромосоме.

При дигенном наследовании, т. е. в случае анализа наследования по двум признакам (*A*, *a* и *B*, *b*), в потомстве возникают уже не 6 типов асков с определенным расположением аскоспор, а 36 комбинаций асков. При этом можно выделить три основных типа тетрад:

AB, *AB*, *AB*, *AB*, *ab*, *ab*, *ab*, *ab* — родительский дитип (*p*);

Ab, *Ab*, *Ab*, *Ab*, *aB*, *aB*, *aB*, *aB* — неродительский дитип (*nr*);

AB, *AB*, *Ab*, *Ab*, *aB*, *aB*, *ab*, *ab* — тетратип (*t*).

Если гены *A*, *a* и *B*, *b* сцеплены, т. е. расположены в одной хромосоме, то родительский дитип тетрад возникает при отсутствии кроссинговера между генами *A* и *B*, а неродительский дитип и тетратип являются результатом кроссинговера. Если гены *A* и *B* расположены в разных хромосомах и достаточно удалены от центромер, то вероятность появления родительских и неродительских типов составит по $\frac{1}{6}$, а тетратипа $\frac{2}{3}$, т. е. соотношение *p* : *nr* : *t* равно $1 : 1 : 4$. Данное расщепление указывает на то, что скрещиваемые родительские формы отличаются друг от друга по двум несцепленным генам, а также на отсутствие взаимодействия генов. Отклонение от этого соотношения свидетельствует об обратном. Для детального ознакомления с теорией тетрадного анализа рекомендуем обратиться к соответствующим руководствам [169, 170, 171].

XIV.3.2. АНАЛИЗ ГИБРИДОВ ПРИ БЕСПОЛОМ РАЗМНОЖЕНИИ

Для проведения гибридологического анализа грибов, в жизненном цикле которых отсутствует половой процесс, необходимо осуществить синтез гетерокарионов, получить из них гетерозиготные диплоиды, выделить и идентифицировать сегреганты, появляющиеся в результате митотического расщепления диплоида.

XIV.3.2.1. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕТЕРОКАРИОТИЧНЫХ ФОРМ

Для получения гетерокарионов необходимо использовать генетически маркированные штаммы. Маркерами могут служить мутанты по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам. Наиболее ценны ауксотрофные мутанты. Каждый из них в отдельности не растет на среде минимального состава; рост наблюдается только в случае появления гетерокариотических гиф.

Существует несколько способов получения гетерокарионов. Можно провести посев штрихами на питательную среду смешанной суспензии двух штаммов или нанести штрихами перпендикулярно друг другу суспензии разных штаммов. При появлении секторов или обильного роста в местах перекреста штрихов их следует изолировать и отселектировать. Если исходные штаммы несли мутации ауксотрофности, т. е. не могли расти на минимальной среде; то гетерокариотические гифы являются прототрофами и могут быть отселектированы на среде минимального состава.

Другой способ — посев разных штаммов «блоками» [746]. При этом от колоний исходных штаммов отсекают маленькие кусочки агара с грибом и располагают их парами на среде. Блоки обрастают гетерокариотическим мицелием, который отделяют и высевают на селективную среду.

Гетерокарионы можно получить и в жидкой питательной среде. Хасти [612] рекомендует приготовить суспензии двух родительских штаммов в жидкой среде полного состава, а затем капли суспензии нанести на дно чашки Петри и инкубировать 30 ч при оптимальной температуре. Образовавшиеся в каплях комки мицелия следует промыть в стерильной дистиллированной воде и перенести на селективную среду. Можно засеять смесью штаммов пробирки с жидкой средой, получить мицелиальную пленку, отмыть ее в стерильной воде и посеять маленькими кусочками на селективную среду.

XIV.3.2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДИПЛОИДОВ

В результате случайного слияния двух разных ядер в мицелии гетерокариона с очень низкой частотой могут возникать гетерозиготные диплоидные конидии. В отличие от конидий гетерокариона, диплоидные споры растут на минимальной среде. Поэтому посевом большого количества конидий гетерокариона можно отобрать на селективной среде спонтанно возникшие диплоидные клетки. Кроме того, можно индуцировать диплоидизацию ядер в гетерокариотическом мицелии воздействием повышенной температуры [746], обработкой камфорой [757] или УФ-лучами [631].

XIV.3.2.3. ОТБОР РЕКОМБИНАНТОВ

При высокой спонтанной частоте выщепления рекомбинантов у диплоидов конидиальную суспензию высевают на среду полного состава и делают отпечатки с помощью бархата или репликатором на ряд селективных сред. При низкой частоте выщепления сегрегантов митотическую рекомбинацию можно индуцировать облучением суспензии диплоидных спор рекомбиногенными дозами УФ-лучей или воздействием аналога фенилаланина — парафторфенилаланином.

XIV.3.2.4. АНАЛИЗ МИТОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Подробно методы анализа митотической рекомбинации рассматриваются в работах С. В. Каменевой [188, 190]. Мы остановимся лишь на основных моментах данного анализа.

В основе митотического расщепления лежат два независимых процесса: гаплоидизация и митотический кроссинговер. При гаплоидизации, вследствие случайной утраты одной из каждой пары гомологичных

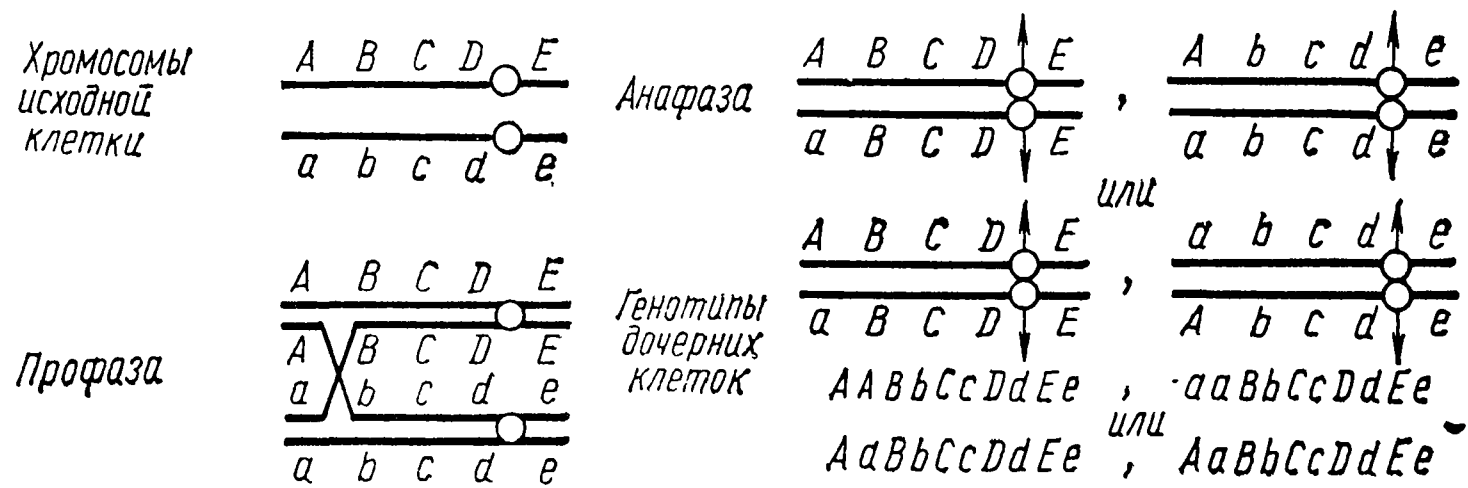
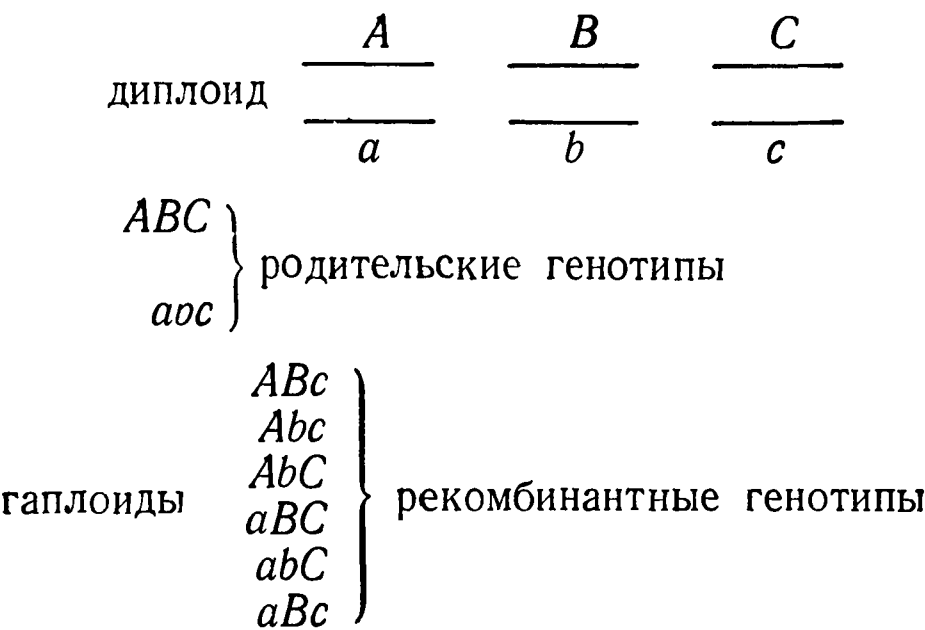


Рис. 120. Схема митотического кроссинговера.

хромосом, из диплоидной клетки выщепляются сегреганты с гаплоидным набором хромосом. Так, у диплоида с тремя парами гомологичных хромосом могут выщепляться два типа гаплоидных клеток родительского генотипа и шесть гаплоидных рекомбинантов:



По результатам расщепления при гаплоидизации могут быть установлены группы сцепления (число хромосом), так как гены одной хромосомы сцеплены и не рекомбинируются, а рекомбинации происходят только между несцепленными генами.

При митотическом кроссинговере происходит образование диплоидных сегрегантов. Схематично расщепление при митотическом кроссинговере представлено на рис. 120.

Предположим, что при совместном культивировании штаммов, маркированных по пяти генам, получен гетерозиготный диплоид $ABCDE/abcde$. Обычно при митозе не происходит конъюгации хромосом, но иногда две гомологичные хромосомы оказываются рядом и между ними возможна конъюгация. Митотический кроссинговер, как и мейотический, происходит в профазе на стадии четырех нитей, т. е. когда две гомологичные хромосомы разделились на две хроматиды, но последние скреплены еще центромерой. После кроссинговера между двумя хроматидами в каждом биваленте оказывается по одной родительской ($ABCDE$ и $abcde$) и одной рекомбинантной хроматиде ($aBCDE$ и $Abcde$). Затем хромосомы отделяются друг от друга, центромеры делятся, и в анафазе хроматиды расходятся по дочерним клеткам. Если в одну дочернюю клетку попадут две рекомбинантные хроматиды, а в другую — нерекомбинантные, то обе клетки останутся гетерозиготными по всем генам и не будут отличаться от родительских. В случае, если в каждую из дочерних клеток попадет по одной исходной и одной рекомбинантной хроматиде, обе клетки окажутся гомозиготными по генам, лежащим дистальнее точки перекреста ($ABCDE$ и $aBCDE$ или $Abcde$ и $abcde$). Одна из них несет гомозиготный набор доминантных аллелей $BCDE$ и фенотипически не отличается от родительских штаммов, а другая — набор рецессивных аллелей $bcde$ и имеет фенотипическое отличие.

Таким образом, в результате митотического кроссинговера образуются рекомбинанты, гомозиготные по всем локусам, находящимся на хромосоме дистальнее точки кроссинговера. Так, в нашем примере при кроссинговере между локусами a и b возникают рекомбинанты, гомозиготные по локусам $bcde$. Если кроссинговер произойдет между локусами b и c , обнаружатся рекомбинанты, гомозиготные по локусам cde . Следовательно, если установлено, что рекомбинанты, гомозиготные по локусу b , одновременно гомозиготны и по локусам cde , значит локусы cde лежат дистальнее локуса b . В этом случае порядок расположения генов на хромосоме будет $b — c (de)$.

Анализ диплоидных рекомбинантов позволяет определить порядок расположения локусов на одном плече хромосомы. По частоте возникновения рекомбинантов разных типов можно рассчитать как расстояние между геном и центромерой, так и расстояние между отдельными локусами.

XV. ГЕНЕТИКА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ПАРАЗИТА И РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

XV.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Существенный вклад в изучение взаимоотношений паразита и хозяина внесли открытия Х. Х. Флора [449], который показал, что каждому гену устойчивости растения-хозяина соответствует комплементарный ему ген вирулентности, позволяющий паразиту преодолеть защитное действие конкретного гена устойчивости и паразитировать на устойчивом хозяине. По Флору, устойчивость, как правило, доминантна, а вирулентность рецессивна. Гипотеза Флора обычно иллюстрируется схемой (табл. 27), где R и r — доминантный и рецессивный аллели гена специфической устойчивости растения, а P и p — доминантный и рецессивный аллели гена вирулентности паразита, «—» — реакция несовместимости, «+» — реакция совместимости паразита и хозяина. Как можно видеть из схемы, совместимая реакция возникает в том случае, если отсутствуют доминантные аллели гена устойчивости либо им соответствует гомозиготное состояние рецессивных аллелей гена вирулентности.

Кроме специфической существует неспецифическая, или горизонтальная, устойчивость, которая контролируется большим числом генов, имеющих очень слабый индивидуальный эффект и проявляющихся только благодаря их суммарному взаимодействию. Неспецифическая устойчивость является количественным признаком и проявляется в удлинении периода инкубации патогена, уменьшении количества спор в одном инфекционном пятне. Предполагается, что эта устойчивость не утрачивается при изменении состава популяции паразита, так как она выходит за рамки его приспособительных возможностей [756]. Поэтому, несмотря на трудности определения, ее использованию придается большое значение. Имеются данные о том, что неспецифическая устойчивость влияет на состав популяции паразита, ее изучение становится элементом исследований взаимоотношений паразита и хозяина. Генетика взаимоотношений паразита и растения-хозяина в настоящее время изучается на разных уровнях.

1. Взаимодействие клеток паразита и растения-хозяина, контактирующих в процессе паразитизма.

2. Взаимодействие генов паразита и хозяина. При этом изучается взаимодействие не только главных генов, но также их модификаторов и полигенных комплексов, определяющих неспецифическую устойчивость хозяина и агрессивность паразита.

3. Взаимодействие популяции паразита и круга его хозяев (культивируемых сортов и дикорастущих растений).

Популяционные исследования связаны с определением спектра вирулентности либо по отношению к определенным генам устойчивости хозяи-

на, либо к сортам-дифференциаторам. Необходимо отметить, что истинное сходство и различие популяций может быть установлено лишь при использовании моногенных линий растений. Изогенные линии растений, содержащие по одному гену устойчивости, тестируют одни и те же гены вирулентности в любых популяциях, что устраняет возможные ошибки при определении сходства популяций.

К числу вопросов, решаемых с помощью изучения популяций патогена, относятся следующие.

1. Изучение степени изоляции популяций патогена в разных районах, определение доли мигрантов в частично изолированных популяциях. Эти исследования необходимы для выбора стратегии борьбы с паразитом. Например, на американском континенте сейчас предпринимается попытка контролировать корончатую ржавчину овса, разместив на обычном пути миграции спор паразита сорта с различными генами устойчивости.

2. Исследование внутрипопуляционных процессов — направление отбора в зависимости от паразитирования на различных растениях-хозяевах, возникновение новых вирулентных форм и закрепление их в популяции. Эти исследования помогают прогнозировать возможные изменения популяции, вызванные введением в культуру сортов с различными типами устойчивости, а также изменения, связанные с составом дикорастущих растений-хозяев. Мутационный процесс является основной причиной возникновения новых вирулентных форм. Уровень спонтанного мутирования гена вирулентности может служить показателем перспективной приспособленности популяции патогена к соответствующему гену устойчивости. Индукция мутаций дает материал для создания маркированных штаммов, пригодных для исследования роли комбинативных механизмов изменчивости — рекомбинации ядер в гетерокарионах, парасексуального процесса. Эти механизмы вносят значительный вклад в изменчивость некоторых видов грибов.

Ниже предлагаются методики, которые облегчают изучение генетических взаимоотношений грибов-паразитов и питающих растений на уровне взаимодействия популяций и отдельных особей. Сюда входят методики лабораторного культивирования возбудителей, удобные для оценки устойчивости растений, выделения редких в популяции вирулентных форм, определения вирулентности клонов, гибридологического анализа устойчивости, мутационного анализа. Предлагаемые методики обеспечивают большую разрешающую способность исследований при минимальной затрате растительного и инфекционного материала. Они основаны на применении отсеченных листьев растений, помещенных в раствор бензимидазола. Методика разработана для систем облигатный паразит *Puccinia recondita* — пшеница и факультативный паразит *Drechslera teres* — ячмень, однако их можно применять с некоторыми модификациями для изучения других систем паразит — хозяин: *Puccinia graminis* — пшеница [761]; *Puccinia sorghi* — сорго [623]; *Erysiphe graminis* — ячмень [378]; *Cladosporium fulvum*, *Phytophthora infestans*, *Macrosporium solani* — томаты; *Erysiphe cichoracearum*, *Ascochyta melonis*, *Colletotrichum lagenarium* — огурцы и др. [238].

Т а б л и ц а 27. Взаимоотношения паразита и хозяина по гипотезе Флора «ген-на-ген»

Алло-тип па-разита	Аллотип хозяина		
	<i>RR</i>	<i>Rr</i>	<i>rr</i>
<i>PP</i>	—	—	+
<i>Pp</i>	—	—	+
<i>pp</i>	+	+	+

XV.2. СБОР И ХРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Простейший способ сбора спор ржавчинных грибов — стряхивание их с пораженных листьев растений в пробирку. Собранные споры подсушивают в течение суток в пробирке без пробки в эксикаторе, на дно которого налита концентрированная серная кислота. Хранят споры в холодильнике при температуре 4° С в эксикаторе над CaCl_2 . Наилучший способ хранения — вакуумные ампулы. При работе с возбудителями гельминтоспориозов зерновых пораженные листья собирают, высушивают и хранят в бумажных пакетах при комнатной температуре.

XV.3. КЛОНИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ

Собранный споровый образец представляет собой часть популяции, приуроченной к определенным видам, сортам растения-хозяина. Для сравнительной характеристики географически отдаленных популяций либо частей одной популяции необходимо их расчленение на составляющие единицы, каковыми для популяций микроорганизмов, размножающихся в основном вегетативно (например, популяций ржавчинных грибов и возбудителей гельминтоспориозов злаков), являются клоны. Для сравнения различных популяций необходимо, чтобы споры грибов были собраны с растений одного сорта.

XV.3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ КЛОНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ

Дно чашки Петри выстилают отрезками листьев универсально восприимчивого сорта, т. е. сорта, восприимчивого практически ко всем клонам популяции. Чашки Петри, приготовленные таким образом, называются газонами (рис. 121). На газоны распыляют споры популяции, суспензированные в 0,0001%-ном растворе детергента Твин-80. Распыление производят пульверизатором из мерной пробирки не более чем по 0,5 мл суспензии на газон. В течение суток газоны выдерживают на рассеянном свете, затем на дно чашек осторожно приливают примерно 20 мл 0,004%-ного водного раствора бензимидазола и помещают их на свету под лампами дневного света ЛДЦ. Интенсивность освещения на рабочей поверхности 2500—3000 лк. Температура культивирования не должна превышать 25° С. Пустулы бурой ржавчины появляются на 6—7-й день. Если суспензия для посева тщательно приготовлена и не содержит комков, то с большой долей вероятности можно считать, что каждая пустула (колония) произошла от одной споры, а споры, содержащиеся в пустуле, одинаковы по генотипу и представляют собою клон.

XV.3.2. ВЫДЕЛЕНИЕ КЛОНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЯЧМЕНЯ

Выделение грибов — факультативных паразитов — в чистую культуру можно проводить как из зеленых, так и из сухих листьев растений. В частности, мицелий гельминтоспориозов злаков сохраняет жизнеспособность в течение нескольких лет. Существует несколько способов изо-

ляции грибов из пораженных растений. Самый простой из них заключается в стерилизации поверхности пораженных листьев в дезинфицирующих растворах (спирта, медного купороса, гипохлорита кальция и др.) и помещении их во влажную камеру. Образующиеся через несколько дней на пораженных участках споры гриба сухой иглой переносят на агаровую среду. При выделении гриба в чистую культуру непосредственно на среду из пораженных листьев вырезают участки размером $(5-2) \times (5-2)$ мм, стерилизуют их в 2%-ном растворе медного купороса в течение 2—3 мин и промывают 2 раза в стерильной воде. Затем ку-

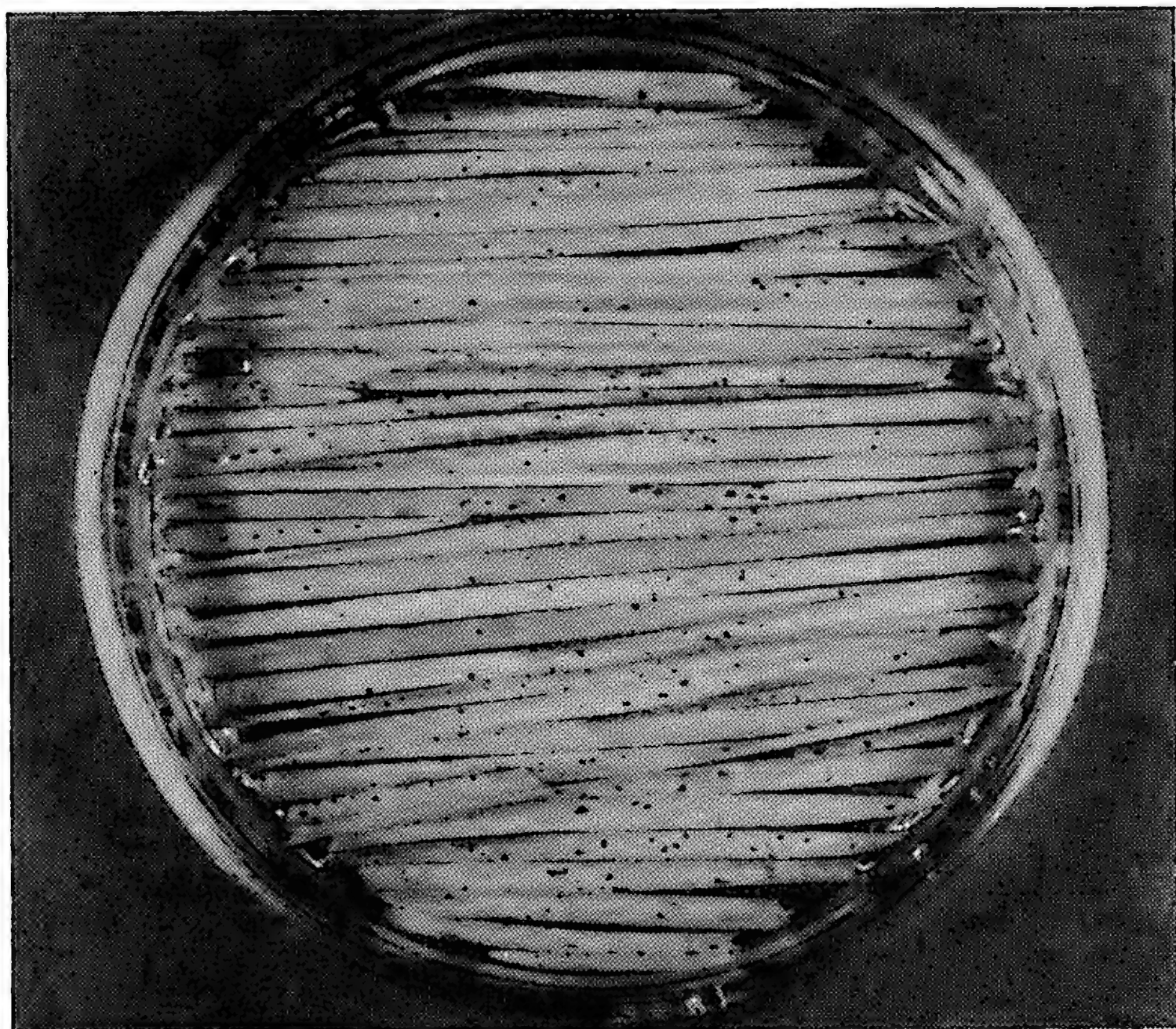


Рис. 121. Газон из листьев пшеницы.

сочки листьев высушивают стерильной фильтровальной бумагой и раскладывают в чашки Петри на поверхность агаровой среды. Состав среды зависит от вида гриба. В частности, при выделении *Drechslera teres* и *Helminthosporium sativum* применяют среду Чапека в модификации Бенкена и др. [36]. Чашки Петри помещают в светоустановку с лампами типа ЛДЦ. Через 4—7 сут, в зависимости от вида гриба, на кусочке ткани листа и среде появляется мицелий с конидиальным спороношением.

Культивирование грибов родов *Drechslera* и *Helminthosporium* на свету (5—7 сут), а затем в темноте (24—48 ч) при температуре 18—20° С обеспечивает обильное конидиальное спороношение. Все изоляты, представляющие определенную популяцию гриба, отсеивают в пробирки на косяки агара и хранят в холодильнике при температуре 4° С. Однако

хранение культуры даже в течение нескольких месяцев меняет ее патогенные характеристики. Поэтому при необходимости получения спорового материала, представляющего популяцию гриба, рекомендуется повторное выделение возбудителя из пораженных листьев.

При клонировании популяции можно использовать споровый материал, полученный при первичной изоляции гриба из пораженных листьев. В случае даже незначительного загрязнения культуры необходим пересев популяции на ту же среду. Для получения клонов гриба споры с поверхности агара собирают микробиологической лопаткой и готовят суспензию в стерильном 0,0001%-ном растворе Твин-80. Суспензию отфильтровывают в случае крупных спор (например, грибов родов *Drechslera* и *Helminthosporium*) сначала через один, а затем через два слоя марли, подсчитывают количество спор в камере Горяева и разводят исходную суспензию до 1000—2000 спор/мл. По 0,05 мл подготовленной суспензии вносят микробиологической пипеткой в чашку с питательной средой и равномерно распределяют ее по поверхности агара, растирая каплю шпателем.

Для грибов рода *Drechslera* характерно образование в культуре обильного воздушного мицелия, который препятствует получению отдельных колоний гриба. Для образования компактных колоний в среду добавляют вещества, ограничивающие рост гриба, такие, как натриевая соль дезоксихолиевой кислоты, свекловичный пектин, тритон, медицинская желчь и др. Применение автоклавированной медицинской желчи (20 мл/л среды) обеспечивает получение несрастающихся (0,5—1 см в диаметре) колоний гриба. Через 5—8 дней каждую колонию отсеивают в пробирку на косяки агара или в чашку Петри для получения спорового материала.

XV.3.3. РАЗМНОЖЕНИЕ СПОР КЛОНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ

Наиболее пригодны для отсева пустулы с газонов на 8-й день после заражения. Для размножения спор одного клона (из одной пустулы) используют отрезки листьев проростков того же универсально восприимчивого сорта. Отрезки длиной 2,5—3 см раскладывают в чашки Петри на два предметных стекла, помещенных на дно чашки. На каждое стекло кладут по три группы отрезков, по 5 в каждой группе. Части отрезков, выходящие за пределы предметного стекла (длиной 0,5—1 см), прикрывают ватой, смоченной раствором бензимидазола. При этом не прикрытые ватой части листьев приподнимаются над стеклом. Отрезки листьев перед заражением опрыскивают дистиллированной водой. Споры от отдельной пустулы переносят микологическим крючком на отрезки листьев отдельной группы. Таким образом, в одной чашке можно размножить споры шести клонов. В течение суток зараженные чашки держат на рассеянном свете (так поступают в любом случае после заражения), а затем помещают в светоустановку. Через 7—8 дней собирают споры, стряхивая их с помощью пинцета в отдельные пробирки с каждых пяти отрезков. После посева спор каждого клона инструмент стерилизуют в пламени горелки. Спор, полученных при таком размножении, обычно достаточно для заражения набора тест-сортов. Для увеличения массы рекомендуется смешать споры с тальком в такой пропорции, чтобы смесь имела слегка розовый оттенок. Для получения большого количества спор, например для индукции мутаций, оценки

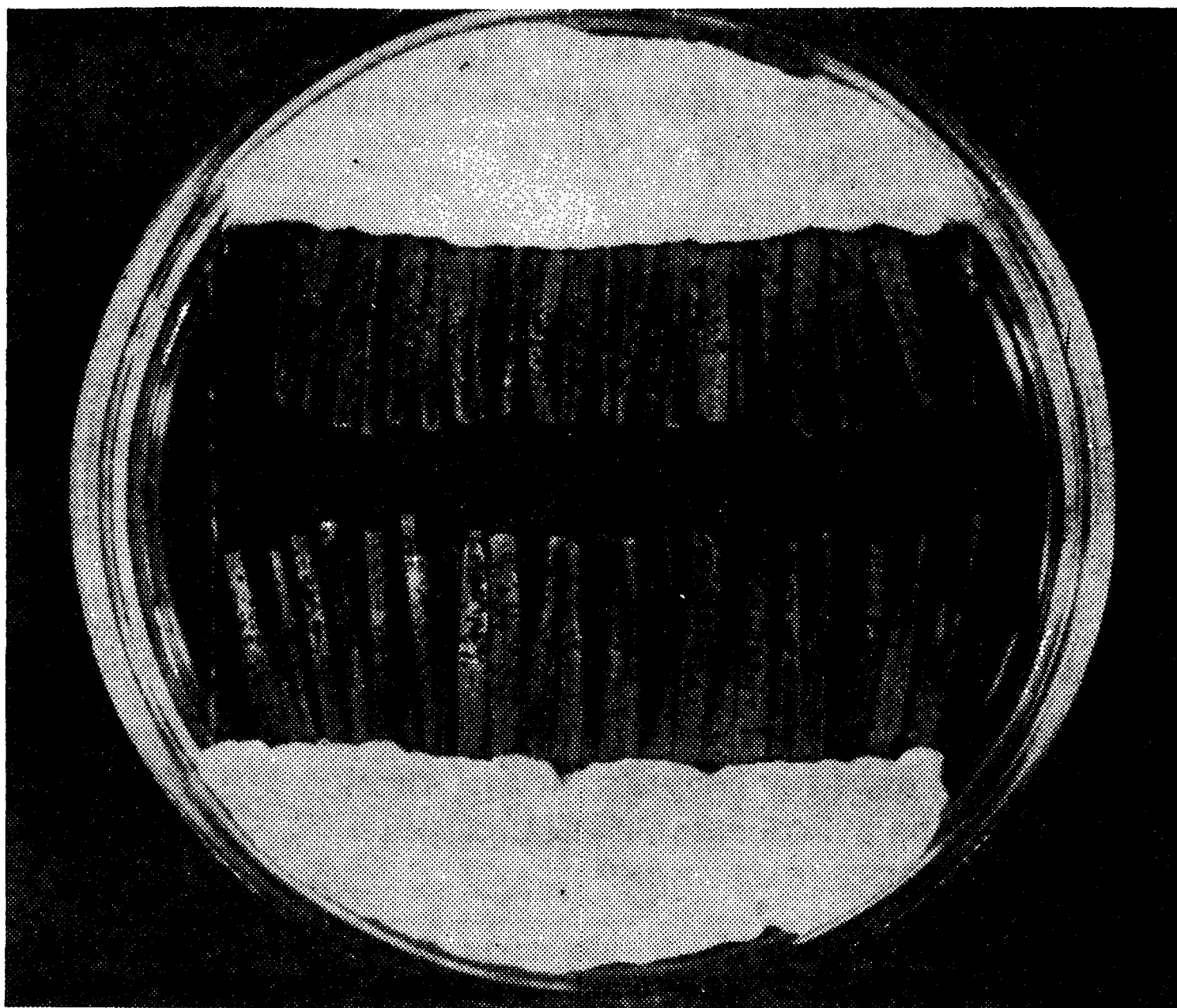


Рис. 122. Размножение клонов возбудителя бурой ржавчины пшеницы в чашках Петри.

агрессивности штаммов, неспецифической устойчивости сортов и т. д., пользуются газонами, приготовленными так, как показано на рис. 122. Здесь листья восприимчивого сорта разложены не группами, а сплошными рядами. Таким образом можно поддерживать коллекции музейных штаммов, размножая споры каждого штамма в отдельной чашке.

XV.3.4. РАЗМНОЖЕНИЕ СПОР КЛОНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕЛЬМИНТОСПОРИОЗОВ ЗЛАКОВ

Для тестирования клонов гриба по вирулентности к определенным наборам сортов в лабораторных условиях достаточно одной чашки Петри со спороносящей культурой каждого клона. Отдельные колонии отсевают на наиболее подходящую для данного вида гриба среду. Следует иметь в виду, что некоторые отсеянные клоны оказываются неспороносящими (для *Drechslera teres* — 15—20%), а для инокуляции необходима только споровая суспензия гриба. Поэтому рекомендуется отсеивать на размножение большее количество клонов, чем это необходимо для последующей работы.

**ХV.4. АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ПАРАЗИТОВ
ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ К ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИМ
НАБОРАМ ЛИНИЙ И СОРТОВ**

В целях дифференциации клонов по вирулентности для возбудителя бурой ржавчины используют набор изогенных линий, полученных на основе сорта Thatcher. Эти линии были выведены в Канаде скрещиванием сорта Thatcher с различными сортами — источниками генов устойчивости — с последующими 6—7-кратными беккроссами. В настоящее время существует более 20 изогенных линий этой серии.

Анализ вирулентности клонов к изогенным линиям дает представление о концентрации соответствующих генов вирулентности в популяциях. При отсутствии изогенных линий популяции патогенов дифференцируют на наборах сортов-дифференциаторов. Из возбудителей гельминтоспориозов зерновых анализ популяций по вирулентности впервые был проведен с возбудителем сетчатой пятнистости ячменя. В результате были отобраны 7 (из 26) сортов с четко различающимися реакциями на заражение отдельными клонами.

**ХV.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛОНОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ
К НАБОРУ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ**

Проростки изогенных линий выращивают на вате, периодически смачиваемой водой. Для заражения используют проростки в стадии первого развернутого листа. Отрезки листьев проростков раскладывают в кюветы, дно которых выстлано слоем ваты, смоченной раствором бензимидазола. Эту процедуру осуществляют следующим образом: 5—6 листьев каждой линии, сложенных вместе, разрезают на отрезки длиной 1—1,5 см столько раз, сколько позволяет длина листьев, складывают в столбики на расстоянии 1—1,5 см друг от друга. Столбики всего набора линий располагают в один горизонтальный ряд. В кювету размером 30 × 40 см можно поместить 30 наборов. Перед заражением кювету

Т а б л и ц а 28. Частота встречаемости клонов, авирулентных к моногенным линиям серии Thatcher в грузинской популяции *Russinia recondita*, %

Сорт	Число клонов	Гены устойчивости линии Thatcher								
		1	2A	3A	3D	10	14	16	17	18
Шавпха	143	93,7	93,7	2,8	6,3	0	2,8	0	11,2	10,5
Ахалцихис цители	112	58,9	59,8	3,6	4,5	3,6	0	0	1,8	2,7
Доли	148	39,9	39,9	7,4	5,4	2,7	1,3	0,7	12,8	8,8
Доли 35/4	182	46,7	45,0	3,3	0	1,6	0	0	13,2	11,5
Арагви	157	43,9	43,9	0	0	1,9	0,6	0	1,9	0,6
Безостая 1	132	15,1	10,2	1,3	0	1,3	0	0	0	0
Кавказ	163	11,6	11,6	3,1	1,2	4,9	2,4	0	1,8	1,2
Лагодехис грдзелтава										

опрыскивают дистиллированной водой. Отрезки листьев каждого набора линий заражают сухими спорами отдельного клона, смешанными с тальком. Для нанесения спор используют микробиологическую иглу. Кювету после заражения вновь осторожно опрыскивают водой из пульверизатора и закрывают стеклом. Через сутки ее ставят в светоустановку. На 8—9-й день отмечают реакцию на заражение патогеном каждой линии (0, 1, 2, 3, 4, X) по шкале Стэкмена—Левина [779]. Для упрощения учета реакции 0, 1, 2 обозначают R, 3, 4, X — S [210]. Описанный способ позволяет за короткое время определить вирулентность большого количества клонов популяции (табл. 28).

**XV.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ КЛОНОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЯЧМЕНЯ
К НАБОРУ СОРТОВ-ДИФФЕРЕНЦИАТОРОВ**

Для приготовления споровой суспензии в чашки Петри приливают 10 мл 0,0001%-ного раствора Твина-80 в дистиллированной воде; полученную суспензию фильтруют через два слоя марли. Для возбудителя сетчатой пятнистости оптимальная концентрация суспензии 5000 спор/мл. При использовании более концентрированных суспензий (30 000—100 000 спор/мл) тип реакции на некоторых сортах изменяет-

Т а б л и ц а 29. Схема идентификации рас *Drechslera teres*

Номер расы	Сорта-дифференциаторы по каталогу ВИР *						
	К 25 270	К 25 282	К 25 275	К 8755	К 19 282	К 18 474	К 19 467
	Сорта-дифференциаторы по системе Хабгуда						
	2 ⁶ 64	2 ⁵ 32	2 ⁴ 16	2 ³ 8	2 ² 4	2 ¹ 2	2 ⁰ 1
4	У	У	У	У	В	У	У
38	У	В	У	У	В	В	У
100	В	В	У	У	В	У	У

П р и м е ч а н и е. У — устойчивость, В — восприимчивость сорта-дифференциатора.
* Всесоюзный институт растениеводства им. Н. И. Вавилова ВАСХНИЛ.

ся в сторону восприимчивости. Отрезки листьев каждого тест-набора, расположенные в ряд, инокулируют отдельными клонами, нанося пастеровской пипеткой по 0,02—0,03 мл споровой суспензии гриба. Через сутки после инокуляции кювету накрывают стеклом и помещают в светоустановку.

Реакцию сорта на заражение патогеном учитывают на 4—5-е сут после инокуляции по четырехбалльной шкале: 1 — высокоустойчивый (точечные некрозы без хлороза); 2 — относительно устойчивый (некротические коричневые пятна с хлоротичным окаймлением или без хлороза, не распространяющиеся по отрезку листа); 3 — восприимчивый (некротические пятна с хлорозом, распространяющиеся по отрезку листа); 4 — высоковосприимчивый (некротизирован весь отрезок листа).

Балл 0 в предлагаемой шкале отсутствует, поскольку абсолютно непоражаемых сортов при лабораторном методе инокуляции выявить не удалось. Реакции растения, оцененные баллами 1 и 2, соответствуют устойчивости, баллами 3 и 4 — восприимчивости. При обработке полученных данных учитывают количество и частоту встречаемости рас, а также концентрацию вирулентных клонов к отдельным сортам-дифференциаторам в различных популяциях возбудителя. Зарегистрированные расы удобно нумеровать по методу Хабгуда [605]. При этом сорта-дифференциаторы располагаются в строго определенном порядке

Т а б л и ц а 30. Сравнительная характеристика популяций по признаку вирулентности (популяции собраны с сорта Фаворит), %

Сорт-дифференциатор по каталогу ВИР	Количество вирулентных клонов в популяциях			Сравнение популяций		
	ленинградской	московской	латвийской	ленинградской и московской	ленинградской и латвийской	московской и латвийской
К 25 270	24,2	15,6	29,2	0,86	0,40	1,17
К 25 282	27,3	28,1	66,7	0,07	3,12	3,03
К 25 275	0	0	0	0	0	0
К 8 755	9,1	28,1	16,2	1,99	0,81	1,02
К 19 282	27,3	28,1	66,7	0,07	3,13	3,03
К 18 474	36,4	59,4	70,8	1,88	2,71	0,88
К 19 467	6,1	18,7	25,0	1,55	1,90	0,55

П р и м е ч а н и е: $p \geq 0,95$ при $t_d \geq 1,96$.

и каждому сорту присваивают бинарный номер от 2^0 до 2^6 . Для определения номера расы достаточно сложить числа бинарных сортов, которые проявляют реакцию восприимчивости к данной расе (табл. 29). Так, например, раса 4 вирулентна только к образцу К 19 282, бинарный номер которого — 4, а раса 38 вирулентна к образцам К 25 282, К 19 282, К 18 474 ($32 + 4 + 2$). Таким образом, номер расы становится информативным. Его можно расшифровать и определить, какие сорта-дифференциаторы поражаются данной расой. Для этого нужно 2 возвести в максимальную степень, чтобы сумма полученных чисел составляла номер расы. Например, раса $100 = 2^6 + 2^5 + 2^2 = 64 + 32 + 4$, т. е. раса 100 вирулентна к сортам с бинарными номерами 64, 32, 4. На основании данных о количестве вирулентных клонов к отдельным сортам-дифференциаторам можно определить сходство или различие определенных популяций возбудителя болезни (табл. 30).

XV.5. ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Появление спонтанных и индуцированных мутантов — весьма редкое явление. Для их выделения и определения частоты встречаемости необходимы методики, имеющие большую разрешающую способность. Методика рассева спор на газоны облегчает эту задачу.

XV.5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ СПОНТАННЫХ ВИРУЛЕНТНЫХ МУТАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ИХ ВСТРЕЧАЕМОСТИ В ПОПУЛЯЦИИ

Для выделения редких вирулентных форм из природной популяции (спонтанных мутантов) готовят газоны из листьев устойчивого сорта, служащего селективным фоном, а также из листьев универсально восприимчивого сорта. По 0,5 мл суспензии спор природной популяции рассеивают пульверизатором из мерной пробирки на каждый газон. Через 7—8 дней подсчитывают число пустул на газонах обоих сортов. Коли-

Таблица 31. Частота встречаемости клонов, вирулентных к сортам Аврора и Кавказ, в дагестанской популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы

Год	Сорт	Число проанализированных клонов	Частота встречаемости
1969	Аврора	17 550	1×10^{-4}
	Кавказ	14 550	1×10^{-3}
1970	Аврора	17 800	6×10^{-5}
	Кавказ	11 600	1×10^{-3}

чество пустул на газонах восприимчивого сорта служит показателем числа проанализированных особей. С помощью этой методики выделены спонтанные мутанты, вирулентные к сортам Аврора и Кавказ, из дагестанской популяции возбудителя бурой ржавчины в годы, когда популяция не имела контакта с названными сортами. Частота встречаемости мутантов показана в табл. 31.

XV.5.2. ПОЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ

Мутации по признаку вирулентности и морфологическим признакам были получены у нескольких видов ржавчинных грибов под действием облучения УФ, рентгеновскими лучами и в результате воздействия химическими мутагенами. Обработка спор N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) наиболее эффективна.

XV.5.2.1. ОБРАБОТКА СПОР ХИМИЧЕСКИМИ МУТАГЕНАМИ НА ПРИМЕРЕ N-НИТРОЗО-N-МЕТИЛМОЧЕВИНЫ

НММ растворяют в фосфатном буфере при pH 4,7—5,2 с добавлением Твина-80. Раствор мутагена приливают к сухим спорам в пробирку и энергично размешивают их стеклянной палочкой для получения гомогенной суспензии. Для удаления мутагена и промывания спор используют фильтр Зейтца с двумя прокладками обычной фильтровальной бумаги и одного мембранного фильтра (синпор) с порами разме-

ром 2,5 мкм и более. Фильтр Зейтца помещают в колбу Бунзена. После обработки мутагеном суспензию фильтруют. Мутаген удаляют, отсасывая жидкость насосом. Затем споры промывают несколькими порциями дистиллированной воды.

XV.5.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ СПОР, ВЫСЕЯННЫХ НА ГАЗОН

Промытые споры смывают раствором Твина-80 в мерную пробирку и подсчитывают их концентрацию. После этого по 0,5 мл суспензии высевают на газоны из листьев устойчивого и универсально восприимчивого сорта. Так же поступают с порцией контрольных, необработанных мутагеном спор того же штамма, высевая их менее концентрированную суспензию. Каждую суспензию наносят каплями на предметные стекла, на поверхность которых налит слой 2%-ного водного агара. Через сутки подсчитывают количество живых проросших спор. Таким образом, зная объем и концентрацию высеянной суспензии, количество живых спор в ней, можно подсчитать количество живых спор, нанесенных на каждый газон.

XV.5.2.3. УЧЕТ ВЫЖИВАЕМОСТИ СПОР И ЧАСТОТЫ ПОЯВЛЕНИЯ МУТАНТОВ

Число пустул, появившихся на газоне по прошествии латентного периода, выраженное в процентах числа посеянных живых спор, служит показателем эффективности клонирования штамма (ЭК). Сравнение ЭК обработанных и необработанных мутагеном спор, дает представление о выживаемости спор, обработанных мутагеном. При сравнении числа пустул, появившихся на устойчивом сорте и в контрольных чашках восприимчивого сорта, можно узнать частоту возникновения вирулентных мутантов. Если на газонах восприимчивого сорта окажутся мутанты по морфологическим признакам (пустулы с измененной окраской) или мутанты по признакам агрессивности (продолжительность латентного периода, размеры пустул), то частоту их появления можно подсчитать, соотнося их количество с количеством пустул на контрольных газонах. Посев необработанной суспензии предпринимается также для выявления частоты спонтанного возникновения мутантов. Пользуясь описанной методикой, можно установить зависимость выживаемости спор от дозы мутагена и частоту возникновения мутантов.

XV.5.2.4. ОБРАБОТКА СПОР УФ-ЛУЧАМИ

Для обработки УФ-лучами можно использовать как сухие споры, нанесенные очень тонким слоем на бумагу, так и суспендированные в растворе Твина-80. Облучение производят лампами БУВ.

XV.6. ОЦЕНКА СОРТОВ РАСТЕНИЙ-ХОЗЯЕВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ

Существует два вида специфической устойчивости: проростковая, которая проявляется на всех фазах онтогенеза, и устойчивость взрослых растений, проявляющаяся в фазе флаг-листа. Проростковую устойчивость можно оценить в лаборатории, устойчивость взрослых растений целесообразно учитывать в поле. Инфекционным материалом для оценки

устойчивости на первом этапе должны быть природные популяции или представительные выборки клонов из них. Оценка устойчивости к природным популяциям позволяет разделить сорта на устойчивые и восприимчивые к конкретным популяциям паразитов. Количественно эффективность источника устойчивости против данной популяции паразита определяют подсчетом числа клонов в природной популяции паразита (в процентах), авирулентных к источнику устойчивости. Эффективность 90% и выше считается приемлемым уровнем для селекционного использования источника устойчивости.

XV.6.1. ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ

Специфическую устойчивость, детерминированную генами устойчивости, эффективными в течение всего онтогенеза растений, определяют на проростках в стадии первого развернутого листа. Проростки выращивают на вате, периодически обильно смачиваемой водой. Семена сеют группами с соответствующими этикетками для каждой группы. В одной кювете размером 30 × 40 см можно вырастить проростки 25 сортов. Для оценки необходимо иметь не менее 10 проростков.

Отрезки листьев длиной 1 см раскладывают в кювету на слой ваты, смоченной раствором бензимидазола. Каждый сорт представлен отдельной группой отрезков также с соответствующей этикеткой. В разных местах кюветы помещают отрезки листьев универсально восприимчивого сорта для контроля успешности заражения. В одну кювету можно поместить отрезки не менее 100 сортов. Заражение производят опрыскиванием суспензией спор, представляющих либо популяцию, либо отдельный штамм, в зависимости от задачи опыта. Кювету закрывают стеклом и через сутки ставят на свет. Через 8 дней учитывают тип инфекции. Сорта с типом инфекции 0, 1, 2 считаются устойчивыми; с типом 3, 4, X — восприимчивыми.

XV.6.2. ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЯЧМЕНЯ К ВОЗБУДИТЕЛЮ СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ

Растения ячменя подготавливают для оценки специфической устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости так же, как и для оценки устойчивости к возбудителю бурой ржавчины. Отрезки листьев инокулируют пастеровской пипеткой, нанося каплю суспензии на каждый отрезок. Размер отрезков листьев ячменя, подготовленных к инокуляции, 1,5—2 см. Для инокуляции используют суспензию концентрацией около 5000 спор/мл. Учет типа реакции проводят на 4—5-е сут по описанной выше шкале (см. раздел XV.4.2).

Для определения эффективности источника устойчивости к определенной популяции паразита проводят тестирование к нему большого количества клонов по вирулентности.

XV.6.3. ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ И АГРЕССИВНОСТИ ШТАММОВ ГРИБА

Критериями неспецифической устойчивости растений и агрессивности паразита служат показатели его репродуктивной способности. К ним относится урожай спор на единицу листовой поверхности растения,

выраженный в количестве пустул (или инфекционных пятен) и в количестве спор на пустулу (пятно). Другим показателем неспецифической устойчивости и агрессивности является длительность латентного периода.

ХV.6.3.1. ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ

Неспецифическая устойчивость растений проявляется как в стадии проростков, так и в стадии взрослых растений. В процессе онтогенеза уровень неспецифической устойчивости меняется. Это изменение происходит разными темпами и выражено в разной степени у разных сортов, поэтому иногда оказывается, что сорта, устойчивые в стадии проростков, утрачивают это свойство в стадии взрослых растений и наоборот.

Т а б л и ц а 32. Оценка неспецифической устойчивости пшеницы сорта Моцинаве к бурой ржавчине

Сорт	Среднее количество пустул на газон		Количество спор в пустуле		Индекс устойчивости
	абсолютное	по отношению к стандарту	абсолютное	по отношению к стандарту	
Моцинаве	200	0,16	256	0,52	0,083
Саратовская 29 (проростки) — стандарт	1555	1,0	493	1	1

рот. Поэтому для определения неспецифической устойчивости следует пользоваться растениями в фазе флаг-листа. При этом большое значение имеет выбор инфекционного материала. Таковым могут служить споры одного штамма гриба, одинаково вирулентного ко всем испытуемым сортам. Поскольку неспецифическую устойчивость определяют лишь при сравнении сортов, необходимо иметь сорт-стандарт, который удобно использовать в стадии проростков.

Растения выращивают в климатической камере или в оранжерее. Для опыта используют флаг-листья 2—3-дневного возраста. Листья укладывают в чашки Петри, как это описано в разделе ХV.3.1. Каждый сорт должен быть представлен 7—10 газонами. Каждый газон опрыскивают 0,5 мл споровой суспензии. Концентрация суспензии $(5—10) \cdot 10^3$ живых спор/мл. Через 9 дней учитывают количество пустул на газон и урожай спор на пустулу. Для учета последнего показателя аккуратно отсекают части листьев с пустулами и погружают их в пробирку. Желательно, чтобы общее количество пустул было не менее 300. Затем к отрезкам листьев приливают 2 мл раствора Твина-80 и каждую пробирку энергично встряхивают в течение 2 мин. После этого в камере Горяева подсчитывают концентрацию спор в 1 мл полученной суспензии. Зная число пустул, приходящееся на 1 мл суспензии, и концентрацию спор в суспензии, легко подсчитать число спор в одной пустуле. Среднее число пустул выражают в относительных единицах к соответствующим данным сорта-стандарта. Произведение полученных относительных показателей и является индексом устойчивости. В качестве примера приве-

дено вычисление индекса неспецифической устойчивости сорта Моцина-ве (табл. 32). Стандартом при оценке служил сорт Саратовская 29 в стадии проростков.

**ХV.6.3.2. ОЦЕНКА АГРЕССИВНОСТИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
БУРОЙ РЖАВЧИНЫ И СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЯЧМЕНЯ**

Агрессивность штаммов оценивают по показателям эффективности клонирования, урожаю спор в одной пустуле и продолжительности латентного периода по отношению к одному и тому же сорту растения. При оценке агрессивности штаммов суспензии их спор, приготовлен-

Т а б л и ц а 33. Характеристика агрессивности штаммов возбудителя бурой ржавчины

Мутантный штамм	Латентный период, ч	Число спор в пустуле	Эффективность клонирования
НММ-1	10	148	$3,6 \pm 0,57$
НММ-2	10	—	$1,3 \pm 0,18$
НММ-3	13	222	$0,2 \pm 0,06$
Исходный штамм	7	2000	$5,5 \pm 0,82$

Т а б л и ц а 34. Агрессивность штаммов возбудителя сетчатого гельминтоспориоза на сортах ячменя

Сорт	Штамм		t_d
	60-16	161 В	
Пиркка	$83,2 \pm 5,7$	$160,6 \pm 7,3$	8,3
Мур	$178,5 \pm 14,5$	$209,1 \pm 5,7$	2,0
Харбин	$35,8 \pm 5,1$	$37,2 \pm 1,6$	0,2

П р и м е ч а н и е: $p \geq 0,95$ при $t_d \geq 1,95$.

ные примерно в равных концентрациях, рассеивают на поражаемые ткани растений. Для примера приводим результаты оценки агрессивности мутантных штаммов, обработанных НММ (табл. 33) по отношению к проросткам сорта Саратовская 29 и агрессивности двух штаммов возбудителя сетчатой пятнистости ячменя (табл. 34).

**ХV.7. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ**

Основным способом изучения наследования устойчивости является гибридологический анализ: скрещивание различающихся по устойчивости сортов и анализ расщепления во втором гибридном поколении (F_2). Для идентификации генов устойчивости (т. е. для установления их отличия или тождества с уже известными генами) кроме анализа гибридов используют также фитопатологические тесты, заключающиеся в сравнении реакций изучаемых сортов с реакциями линий — носите-

лей известных генов устойчивости (например, линий серии Thatcher). Эти сравнения правильнее использовать не для обнаружения известных генов у исследуемого сорта, а для того, чтобы исключить их присутствие.

XV.7.1. ИНФЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ГИБРИДОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Клоны для гибридологического анализа должны быть чистыми и вызывать отчетливую реакцию сверхчувствительности у изучаемых сортов. Если анализируется потомство от скрещивания двух устойчивых сортов, тест-клоны должны быть авирулентны к обоим. Когда анализируемые сорта обладают достаточно эффективной устойчивостью, клоны, удовлетворяющие этим требованиям, встречаются часто и их подбор не вызывает затруднений.

XV.7.2. ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ

Проявление устойчивости хозяина зависит от генотипа паразита, и случайно выбранный для гибридологического анализа единственный тест-клон гриба мог бы дать случайные результаты. Поэтому обычно для анализа гибридов F_2 применяют несколько тест-клонов. Для этого очень удобно использовать отрезки листа, помещенные в бензимидазол. В этом случае экспериментатор получает возможность сопоставлять реакции каждого генотипа F_2 не менее чем к пяти тест-клонам паразита, что значительно уточняет анализ. Популяцию F_2 выращивают на слое ваты, смоченной водой. Для заражения используют 7—8-дневные проростки. Перед началом работы подготавливают небольшие кюветы (примерно 12×20 см). Число кювет соответствует числу тест-клонов, имеющихся для анализа популяции F_2 . Дно кювет выстилают ватой, смоченной бензимидазолом.

Очередность операций при раскладке должна обеспечить строгую идентичность положения отрезка листа каждого источника во всех кюветах. Для этого из пучка срезанных листьев F_2 , помещенных в стаканчик с водой, берут один произвольный лист, разрезают его на отрезки 1,5—2 см. Число отрезков должно соответствовать количеству клонов паразита. По одному отрезку помещают пинцетом в левый верхний угол каждой кюветы. Аналогично поступают со всеми проростками и раскладывают отрезки вплотную друг к другу в ряд. Между каждыми 10 отрезками в ряду помещают контрольные отрезки листьев обеих родительских форм гибрида и чувствительного сорта. Промежуток между отрезками листьев гибридов и контрольными отрезками должен быть не менее 4—5 мм для того, чтобы облегчить сопоставление реакций. Второй ряд укладывают вплотную к первому без интервала. Чем плотнее уложены отрезки, тем меньше расход инокулюма. Таким образом, все кюветы идентичны по составу и расположению отрезков, каждый отрезок при этом представляет отдельное растение. Каждую кювету заражают определенным клоном возбудителя из пульверизатора суспензией свежесобранных спор в растворе Твина-80. Концентрация суспензии $(5—10) \cdot 10^3$ спор/мл. На каждом отрезке листа проявляется около 5—10 пустул. При использовании более концентрированной суспензии тип реакции проявляется нечетко, при менее концентрированной — часть чувствительных генотипов может оказаться незараженной и соот-

ношение фенотипов в гибридной популяции будет искажено. Расход суспензии составляет около 1—1,5 мл на каждые 10 см². После заражения каждой кюветы пульверизатор кипятят, готовят суспензию следующего клона и распыляют ее на следующую кювету или следующую группу кювет, если несколько разных популяций F_2 заражают одним клоном. Результат учитывают на 8—9-й день после заражения, оценивая реакцию растения на заражение по шкале Стэкмена. Учет в более поздние сроки может привести к искажению результатов, поскольку нарастающие в пустулах массы спор могут закрыть узкие зоны хлорозов вокруг пустул. Вследствие этого часть реакций типа 2 может быть отнесена к типу 3. После оценки реакций экспериментатор располагает характеристикой устойчивости каждого гибридного генотипа F_2 к нескольким клонам паразита.

Преимущество техники отсеченных листьев заключается и в том, что растения, используемые для анализа, сохраняют способность к репродукции. Растения выращивают в сосудах с нормальной для репродукции плотностью; через 5 дней после появления всходов их нумеруют и отрезают от каждого по половине первого листа для анализа. При этом уже в F_2 можно выделить растения, имеющие только один ген устойчивости из двух, что важно для получения серий моногенных линий, а также растения, сочетающие оба гена устойчивости, что используется в селекционных целях.

XV.7.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ

Идентифицировать ген устойчивости — значит определить его тождество или отличие от ранее известных генов устойчивости, включенных в генетические серии, подобные серии Thatcher, а также выявить его аллельные отношения с уже известными генами устойчивости. Для преодоления разных аллелей одного локуса, контролирующего устойчивость хозяина, паразиту требуются разные, чаще всего независимые, гены вирулентности. В этом смысле разные аллели одного локуса ведут себя так, как если бы это были разные гены устойчивости. Поэтому отличия, устанавливаемые с помощью фитопатологических тестов, не дают информации об аллельных отношениях изучаемого гена с ранее известными. Об аллелизме, или сцепленности, можно судить только по результатам анализа гибридов.

XV.7.3.1. УСТАНОВЛЕНИЕ ОТЛИЧИЙ ОТ ИЗВЕСТНЫХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ПО ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКИМ ТЕСТАМ

В условиях приведенного эксперимента нетрудно исключить ответственность уже известных генов серии Thatcher за устойчивость изучаемого сорта. Для этого достаточно показать отличие спектра его реакций устойчивости к набору клонов гриба от реакций изогенных линий. Большинство клонов возбудителя бурой ржавчины, составляющих природные популяции, универсально вирулентны, т. е. вирулентны ко всем генам, входящим в серию Thatcher, кроме *Lr9* и *Lr19*. Если сорт устойчив к таким клонам, значит защищающий его ген не может быть тождественным ни одному из известных генов, кроме, возможно, *Lr9* и *Lr19*. Подобрать клоны, вирулентные к *Lr9* и *Lr19*, практически невозможно. Значительно проще найти клоны, вирулентные к изучаемым сортам.

Процедура выделения таких клонов описана в разделе XV.5.1. Если эти клоны окажутся авирулентными к линиям Thatcher *Lr9* и *Lr19*, то можно считать доказанным, что изучаемый сорт защищен геном, отличным от *Lr9* и *Lr19*. После того как доказано отличие изучаемого гена от известных, остается выяснить его аллельные отношения с ними.

XV.7.3.2. УСТАНОВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ОТНОШЕНИЙ С ИЗВЕСТНЫМИ ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ

Известно, что гены устойчивости часто образуют аллельные серии и сцепленные блоки. Изучаемый ген устойчивости может оказаться известным ранее аллельным состоянием одного из генов, имеющих в серии Thatcher, или может быть с ним сцеплен. В таком случае его можно локализовать, не прибегая к анеуплоидному анализу. Для этого скрещивают изучаемый сорт и линии серии Thatcher, несущие известные гены, и затем по расщеплению в F_2 судят об аллельности или сцепленности с каким-либо из этих генов.

Тест-клоны для анализа F_2 должны быть авирулентными к обоим компонентам скрещивания: к устойчивому сорту и к соответствующей линии Thatcher. Главная трудность состоит в подборе клонов, авирулентных к линиям Thatcher, так как такие клоны в наших популяциях встречаются с частотой менее 1%. Чтобы отыскать эти клоны можно пользоваться упрощенным клоновым анализом популяций гриба.

XV.7.3.3. УПРОЩЕННЫЙ ВАРИАНТ КЛОНОВОГО АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИЙ ГРИБА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛОНОВ С РЕДКИМИ АЛЛЕЛЯМИ АВИРУЛЕНТНОСТИ

Методика выделения клонов гриба с редкой вирулентностью описана в разделе XV.5.1. Однако она непригодна для выделения клонов с противоположной характеристикой, для которых не существует селективных сред. В таком случае поступают следующим образом. Суспензией спор природной популяции низкой концентрации заражают газоны из листьев чувствительного сорта (см. раздел XV.3.1) или чашки Петри, используемые для размножения инфекционного материала (см. раздел XV.3.3). Через 8—9 дней после заражения, когда разовьются пустулы, готовят кюветы для анализа. Для этого в кювету на слой ваты, смоченной бензимидазолом, раскладывают парами отрезки листьев. В каждую пару входит отрезок линии, к которой нужно отыскать авирулентный клон, и отрезок чувствительного контроля. Длина отрезков около 1 см. Чтобы их не смешивать, отрезки чувствительного сорта можно сделать длиннее — около 1,5 см. По два отрезка кладут вплотную друг к другу; отрезок линии располагают всегда слева, отрезок контроля всегда справа. Расстояние между парами в ряду, а также между рядами по вертикали около 0,5 см.

Подготовленные таким образом отрезки листьев в кюветах обильно опрыскивают водой из пульверизатора и приступают к заражению. Микробиологическую иглу прокалывают на спиртовке, охлаждают в чашке Петри с водой и переносят споры из хорошо развитой и одиночно расположенной пустулы на одну пару отрезков, сначала на отрезок листа линии Thatcher, а затем на чувствительный контроль. После этого иглу вновь прокалывают, охлаждают и переносят следующую пустулу на следующую пару отрезков. Так последовательно заражают все пары. Кюветы накрывают стеклом и через сутки ставят на свет, а через 7—8

дней анализируют результаты. Представляют интерес только пары, на которых отрезок линии Thatcher имеет хорошо выраженную реакцию несовместимости типа 0, 1 или 2, а восприимчивый контроль — пустулу чувствительного типа 3 и 4. Споры с таких пар переносят микробиологической иглой в чашки Петри на отрезки листьев сорта растения, восприимчивого к инфекционному материалу (см. раздел XV.3.1). В эту же чашку Петри кладут для контроля 2—3 отрезка листа той линии, к которой требуется найти авирулентный клон.

Размноженный и проверенный инфекционный материал используют для заражения F_2 от скрещивания изучаемого источника с соответствующей линией серии Thatcher и по поведению F_2 судят об аллельности или сцеплении изучаемого гена с известными ранее. Методика этой работы описана в разделе XV.7.2. Процедура идентификации генов устойчивости рассмотрена там на примере пшеницы и бурой ржавчины. Однако сходная методика может быть применена ко многим другим парам паразит — хозяин, где имеется набор изогенных линий растения-хозяина: пшеница — мучнистая роса, пшеница — стеблевая ржавчина, пшеница — желтая ржавчина, ячмень — мучнистая роса и др. [378].

XVI. ОТНОШЕНИЕ ГРИБОВ К СВЕТУ, УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ЛУЧАМ И ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЯМ

XVI.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Свет играет значительную роль в процессе формирования микофлоры растительных остатков, эпифитной микофлоры, сообществ грибов, находящихся на поверхности почвы. Изучение его действия в строго определенных условиях эксперимента способствует выяснению ряда вопросов экологии и таксономии грибов. Так, большей устойчивостью конидий *Pleospora herbarum* по сравнению с его аскоспорами объясняется преимущественное развитие в весенне-летние месяцы конидиальной стадии гриба [665]. Повышенной устойчивостью многих видов *Dematiaceae* к свету и УФ-лучам определяется наряду с другими экологическими факторами преобладание их в пустынных и высокогорных почвах и в высоких слоях земной атмосферы (3000—6000 м) [116, 205, 308, 572].

В лабораторных условиях изучают влияние видимого света и спектральных лучей на скорость роста грибов, интенсивность спороношения, фототропизм, характер фоторецепторов [156, 387, 507, 536, 587, 665—667]. Изучение спектра мутаций облученных грибов в ряде случаев может послужить основанием для пересмотра существующих представлений о границах того или иного вида, а подчас и рода [256, 257, 621]. Изучение действия света, а также УФ-лучей предполагает применение четко разработанных и достоверных методов.

XVI.2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ВИДИМОГО СВЕТА НА ГРИБЫ

Солнечный свет состоит из УФ-лучей с длиной волны до 400 нм, видимого света — 400—750 нм и ИК-лучей — от 750 нм и более [51, 226]. Лучам определенной длины волны соответствуют определенные области спектра (табл. 35).

XVI.2.1. ИСТОЧНИКИ ВИДИМОГО СВЕТА

Источником видимого света служат люминесцентные лампы и обычные лампы накаливания. Последние выделяют много тепла, а потому при работе с ними рекомендуется применять водные фильтры с непрерывным током воды (см. рис. 123). В качестве мощных источников видимого, а также УФ-света широко используют ртутные и ксеноновые дуговые лампы высокого давления [111, 187]. Применяя жидкостные, газовые,

Т а б л и ц а 35. Спектральные области видимого света

Видимая область спектра	Диапазон длин волн, нм	Типичная длина волны, нм	Видимая область спектра	Диапазон длин волн, нм	Типичная длина волны, нм
Фиолетовая	390—455	430	Желто-зеленая	550—575	560
Синяя	455—485	470	Желтая	575—585	580
Голубая	485—505	495	Оранжевая	585—620	600
Зеленая	505—550	530	Красная	620—760	640

стеклянные или интерференционные светофильтры, можно вычленить любую часть видимого спектра. Интенсивность и дозу видимого света измеряют соответствующим образом прокалиброванными термоэлементами, фотоэлементами или химическими актинометрами.

**XVI.2.2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОСВЕЩЕНИИ ГРИБОВ**

Поскольку видимая область солнечного спектра, в отличие от УФ-лучей, не относится к сильнодействующим мутагенным факторам, ее действие изучают в основном качественно, без строгого количественного учета полученных результатов. Эти исследования касаются изучения влияния постоянной освещенности грибов видимым светом на их рост по сравнению с ростом культуры в темноте [581, 610, 668] или при чередовании света и темноты [638, 669]. Как правило, такие эксперименты проводят в темном боксе для исключения влияния дневного света. Расстояние облучаемого объекта от источника облучения всегда строго выдерживается. Исследуемую культуру в виде инокулюма определенного диаметра или стандартизованной суспензии помещают на поверхность питательной среды в чашки Петри и экспонируют в заданных условиях освещения определенное время. В конце опыта учитывают культуральные и морфологические изменения изучаемого гриба, а также, в зависимости от целей исследования, его физиологическую активность.

Инокулюм вырезают профламбированным скальпелем обычно из предкраевой зоны колонии, растущей на твердой питательной среде, и помещают на исследуемый субстрат. Возраст колонии и место взятия инокулюма должны быть всегда одинаковыми. Инокулюм обычно имеет квадратную или треугольную форму (5 × 5 мм), возраст культуры 10—15 сут. Следует отметить, что в методах по изучению действия света на грибы почти отсутствуют количественные характеристики полученных результатов. Исключение составляет метод [668], согласно которому действие света оценивают по количеству образовавшихся конидий на определенном участке колоний.

Изучению фоторецепторов, определяющих реакцию организма на световое воздействие, придают большое значение [536, 571, 795]. Большинство исследователей придерживаются гипотезы множественности фоторецепторов, из которых к наиболее изученным относятся каротиноидные и флавиновые пигменты. Для доказательства принадлежности вещества к фоторецепторам используют мутанты, дефектные по этому

соединению. Так, уменьшение фоточувствительности исходных культур, содержащих каротиноидные или меланиновые пигменты, по сравнению с апигментными мутантами является одним из косвенных доказательств принадлежности к фоторецепторам [156, 558, 803]. Обратимость фотоэффекта (по критерию интенсивности спороношения) при чередовании освещения голубым и фиолетовым светом или голубым и красным с длинноволновым красным позволила установить наличие двух фоторецепторов у гриба *Botrytis cinerea* [795]. Прямые доказательства существования фоторецепторов связаны с выделением, очисткой и изучением их физико-химических свойств [156, 666].

XVI.2.3. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ УФ-ЛУЧЕЙ НА ГРИБЫ

УФ-излучение составляет 1—10% общей солнечной радиации, достигающей поверхности земли. Количество и качество УФ-лучей определяется прозрачностью земной атмосферы, положением Солнца, комплексом метеорологических и географических условий.

XVI.2.3.1. ФИЗИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ИСТОЧНИКИ ИЗЛУЧЕНИЯ, ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ, ДОЗИМЕТРИЯ

УФ-область солнечного спектра, к которой относятся лучи с длиной волны менее 400 нм, в свою очередь делится на длинноволновую, А (320—380 нм), средневолновую, Б (280—320 нм) и коротковолновую, С (200—280 нм) области, а также область вакуумного ультрафиолета (20—200 нм) [226].

Самым распространенным источником искусственного УФ-излучения является электрический разряд в парах ртути. При низком давлении паров ртути преобладает излучение с длиной волны 254 нм. С увеличением давления паров ртути излучение изменяется в сторону длинноволнового. Принципиально могут быть созданы лампы с преобладанием излучения в любом заданном участке области УФ-спектра. В настоящее время выпускаются ртутные лампы низкого давления — БУВ и ЗУВ — мощностью 15—80 Вт. Лампы высокого давления типа ПРК являются источниками преимущественно длинноволнового излучения. В качестве источника УФ-излучения в микробиологии обычно применяют продозиметрированную лампу типа БУВ, включенную в сеть через стабилизатор напряжения. Лампу с отражателем фиксируют в определенном положении. Расстояние от облучаемого объекта до поверхности лампы должно быть постоянным. Максимальный биологический эффект оказывают УФ-лучи с длиной волны 260—270 нм, так как они поглощаются нуклеопотеидами. По действию УФ-лучей на растительные и животные объекты различают бактерицидное и эритемное излучения. Первое связано с коротковолновыми лучами (до 280 нм) и оценивается по способности уничтожать микроорганизмы. Эритемное излучение вызывает покраснение кожи человека или животных.

Интенсивность (F) лучевого потока [287] обычно выражают в ваттах. Поверхностная плотность падающего на облучаемую поверхность УФ-потока: $E = F/s$, где s — площадь облучаемой поверхности. Дозу УФ-облучения определяют уравнением $H = Et$, где t — время облучения.

Основные методы УФ-дозиметрии — химический, термоэлектрический, люминесцентный и фотоэлектрический [187], причем наиболее

широко применяется последний. Приборы для измерения дозы УФ-излучения называются уфидозиметрами. Их действие основано на регистрации фототока, вызываемого фотонами света, попадающими на светочувствительную поверхность фотокатода. Точен и удобен также метод химической дозиметрии [111, 187].

ХVI.2.3.2. РАСЧЕТ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТОВОГО ПОТОКА ЛАМПЫ БУВ-15

Химическим актинометром определяют обычно количество квантов света. Для расчета интенсивности света (Дж/с) необходимо знать среднюю длину волны используемого света. Предположим, что измерения ведутся железooksалатным актинометром [187], действие которого основано на фотовосстановлении Fe^{3+} в $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3$ до Fe^{2+} . Измеряя количество Fe^{2+} , образовавшегося после облучения раствора железooksалата калия в течение определенного времени, и зная квантовый выход реакции фотовосстановления, легко рассчитать количество квантов света, попавших на кювету с актинометрическим раствором (подробный расчет приведен в [187]). Пусть, например, средняя длина волны света $\lambda = 300 \text{ нм} = 30\,000 \text{ см}^{-1}$. Одному кванту света с такой длиной волны соответствует энергия $6,61 \cdot 10^{-12} \text{ эрг/см}^{-1} = 1,986 \times 10^{-16} \text{ эрг/квант} = 11,96 \cdot 10^7 \text{ эрг/эйнштейн}$; $1 \text{ эйнштейн} = 6,02 \cdot 10^{23}$ квантов. Если квантовая интенсивность света, определенная актинометрически, равна $1 \cdot 10^{-10} \text{ эйнштейн/с} = 6,02 \cdot 10^{13} \text{ квант/с}$, то интенсивность светового потока, выраженная в эргах на секунду будет равна $6,61 \cdot 10^{-12} \text{ эрг/квант} \cdot 6,02 \cdot 10^{13} \text{ квант/с} = 398 \text{ эрг/с} = 3,98 \times 10^{-5} \text{ Дж/с} = 3,98 \cdot 10^{-5} \text{ Вт}$.

В процессе работы с источниками УФ-лучей или искусственного солнечного излучения необходимо соблюдать меры предосторожности. При длительной работе таких установок в помещении накапливается значительное количество озона, который нужно выводить либо непосредственно от лампы в вытяжную систему, либо после работы хорошо проветривать помещение. УФ-излучение порядка 250 нм и менее небезопасно для человека, потому смотреть на горящую лампу без специальных очков или находиться под ее лучами запрещается. Особой осторожности требует работа с дуговыми лампами (типа ДРШ или ксеноновых). Излучатель в этом случае помещают в металлический кожух, котсрый непрерывно охлаждается проточной водой.

ХVI.2.3.3. ОБЛУЧЕНИЕ ВОДНОЙ СТАНДАРТИЗОВАННОЙ ВЗВЕСИ СПОР

Выращенные на плотной питательной среде культуры грибов заливают стерильной водопроводной водой и тщательно взбалтывают для отделения спор от мицелия. Полученную суспензию фильтруют через ватный фильтр, разводят до нужной концентрации и подсчитывают число спор в камере Горяева или Тома [288]. Для этого на предметное стекло с сеткой наносят каплю исследуемой взвеси и затем к боковым пластинкам камеры Горяева притирают покровное стекло. Рекомендуются споры подсчитывать в пяти больших квадратах в 3—5 повторностях. Общий объем пяти квадратов составляет $1/50 \text{ мм}^3$, тогда количество спор в 1 мм^3 соответствует их сумме в пяти квадратах, умноженной на 50. Количество спор в 1 мл в 1000 раз больше.

По 4 мл приготовленной таким образом суспензии разливают в обезжиренные, тщательно вымытые и прстерилизованные чашки Петри диаметром 9 см с идеально ровной поверхностью. При соблюдении этих

условий суспензия распределяется по дну чашки тонким слоем толщиной 0,1 мм. Затем чашки Петри помещают на определенном расстоянии от источника УФ-лучей и снимают крышки в момент включения секундомера. Облучение ведут при слабом покачивании в темном боксе. Через заданные промежутки времени чашки закрывают крышками и облученные конидии высевают методом последовательных разведений с последующей заливкой их расплавленным и охлажденным до 40° С суловым агаром. Для исключения темновой репарации и фотореактивации посев проводят сразу после облучения и только при красном свете. Недостаток метода облучения водной суспензии состоит в том, что длительное экспонирование приводит к частичному испарению жидкости, что искажает результаты подсчетов в сторону их завышения. Во избежание этого рекомендуется предварительно установить количество воды, испарившейся за время облучения, и затем довести облученную взвесь до исходного объема [152]. Более точные данные получают при облучении суспензии в чашках из кварцевого стекла, проницаемого для УФ-лучей, или в чашках Петри, накрытых пластинками из оптически чистого кварцевого стекла. При облучении значительных количеств взвеси применяют электромагнитные мешалки. Прорастание спор при заданной дозе облучения определяют, облучая споры грибов в капле воды на предметном стекле с последующей заливкой их питательной средой [97]. Однако отсутствие сравнимых количественных результатов снижает качество эксперимента.

Облучение спор проводят не только для определения их устойчивости к данному излучению (в частности, по критерию выживаемости), но и для получения мутантов, изучения процессов темновой и фотореактивации, углубленного исследования условий, модифицирующих облучение (кислородный эффект, изменение условий температуры, влажности и др.). Необходимый этап работы в этом направлении — исследование радиозащитного эффекта веществ. С этой целью раствор испытуемого вещества (желательно водный) используют для приготовления стандартизированной взвеси конидий гриба, чувствительного к облучению. Контролем служит чувствительность или выживаемость этого же субъекта в воде. По разнице выживаемости конидий после облучения в водном растворе вещества и в воде судят о степени радиозащитного эффекта вещества [160, 277].

О влиянии УФ-излучения на данный вид судят по выживаемости конидий, т. е. количеству макроколоний, выросших из облученных спор по сравнению с необлученными. При этом необходимо одновременно облучить не менее 6—8 чашек со споровой суспензией последовательно увеличивающимися дозами УФ-лучей, что достигается увеличением экспозиции. Экспозицию, как и разведение, подбирают для каждого вида индивидуально. Повторность опытов трехкратная (и более). Учет выросших колоний производят через промежутки времени, установленные для каждой культуры индивидуально. Определение устойчивости к УФ-лучам или искусственному солнечному излучению, графическое изображение выживаемости облученных грибных объектов (дозные кривые выживаемости) и их интерпретацию см. в разделе XVI.4.1.

XVI.2.3.4. ОБЛУЧЕНИЕ СПОР В СУХОМ СОСТОЯНИИ

Метод позволяет исключить действие продуктов радиолиза воды на облучаемые споры.

Приготовленную, как упоминалось выше, водную суспензию спор наносят градуированной пипеткой по 0,01—0,05 мл на целлофан, сталь-

ной диск, желатиновую подложку, целлюлозо-ацетатные или ультрапористые фильтры и другие подходящие субстраты и после подсушивания облучают [87, 542, 672]. После облучения находящиеся на подложке споры тщательно смывают строго определенным количеством воды для получения суспензии клеток и их посева. Иногда облученные субстраты помещают на дно чашки Петри и заливают тонким слоем соответствующей питательной среды для дальнейшего учета выросших колоний. Такая модификация метода имеет много неточностей, так как скопление облученного материала на небольшом участке может привести к большому занижению результатов. В особенности это относится к быстрорастущим гифальным грибам, к которым не применима методика микроколоний [230].

Разновидность облучения в сухом состоянии — метод экспозиции суспензии спор [592], которую наносят на поверхность питательной среды и равномерно распределяют шпателем по всей поверхности облучаемой чашки. Однако в этом случае возможно некоторое изменение питательной среды в результате облучения, которое, в свою очередь, может влиять на выживаемость облученных спор.

Кроме этих основных методов известны методы [557, 666] облучения предварительно выращенной из стандартизованного инокулюма колонии соответствующего гриба. При этом можно учитывать изменение морфологии и интенсивности роста колонии. Указанный метод, по видимому, удобен для биохимического изучения последствий УФ-излучения, поскольку облучается одновременно большое количество нативного материала. Он позволяет получить также качественную характеристику устойчивости облученного материала к действию УФ-лучей. Однако, вследствие небольшой проникающей способности УФ-лучей, этот метод весьма неточен, поскольку не исключено, что облучению подвергается только поверхностная часть колонии.

Из перечисленных методов облучения подсушенных спор наиболее точным является метод Ли [672]. В модифицированном варианте метода на поверхность покровного стекла наносят тонким слоем небольшое количество расплавленного 20%-ного водного раствора желатина [159]. Желатин подсушивают на воздухе и на образовавшуюся желатиновую подложку помещают микропипеткой 0,05 мл водной стандартизованной суспензии спор соответствующего штамма гриба. Для получения монослоя споровая нагрузка видов, диаметр спор которых не превышает 8 мкм, составляет $1 \cdot 10^6$ конидий/мл, крупноспоровых видов (диаметр 10 мкм и более) — $5 \cdot 10^5$. Полученный таким образом образец после высушивания на воздухе облучают. В зависимости от условий облучения желатиновую подложку с нанесенной взвесью спор размещают на покровном стекле или алюминиевой фольге.

Каждый штамм облучают 8—15 последовательно увеличивающимися дозами излучения (экспозиция от нескольких минут до нескольких часов). Образец с облученными спорами помещают в пробирку диаметром 30 мм, заливают 5 мл стерильной дистиллированной воды (разведение 1 : 100). Пробирку, встряхивая, слегка нагревают над пламенем газовой горелки так, чтобы желатиновая подложка сошла с поверхности покровного стекла и растворилась в воде. При этом облученные споры переходят в воду, образуя суспензию, которую в соответствующих, эмпирически подобранных разведениях высевают в чашки Петри и заливают теплым агаром. Инкубирование чашек, учет выросших микроколоний, статистическая обработка данных, повторность опытов аналогичны описанным в разделе XVI.3. Контролем служит выживаемость приготовленных таким же образом необлученных сухих спор.

Модификация не лишена некоторых неточностей, связанных, главным образом, с использованием небольшого (0,05 мл) количества споровой суспензии, однако при соответствующем навыке, аккуратности и точности исполнения позволяет получить вполне достоверные данные.

ХVI.2.3.5. ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЙ ФОТОРЕАКТИВАЦИИ И ТЕМНОВОЙ РЕПАРАЦИИ ГРИБОВ, ОБЛУЧЕННЫХ УФ-ЛУЧАМИ (ПО КРИТЕРИЮ ВЫЖИВАЕМОСТИ)

По существующим представлениям [161, 398, 414, 416, 763], устойчивость микроорганизмов и грибов к облучению обусловлена комплексом факторов, среди которых основным является способность клеточного генома восстанавливаться от лучевых поражений. Фотореактивацию у микроорганизмов на клеточном уровне изучают с помощью следующих методических приемов:

1. Водную суспензию спор облучают определенной дозой УФ-лучей и через разные промежутки времени высевают клеточную суспензию на питательную среду и освещают видимым светом [185, 632]. Так, УФ-облученные на уровне ЛД₉₈ конидии непосредственно после облучения освещают видимым светом в течение 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 и 300 мин [153]. Источник освещения — лампа накаливания мощностью 300 Вт с зеркальным отражателем и водным охлаждением. Стакан с суспензией конидий помещают на магнитную мешалку и для предотвращения испарения закрывают кварцевой крышкой. Через указанные промежутки времени из освещаемых образцов отбирают по 1 мл взвеси, которую немедленно высевают и заливают теплой питательной средой. Посев ведут только при красном свете (рис. 123). Кинетику процесса фотореактивации определяют по увеличению выживаемости освещенных в течение определенного времени УФ-облученных спор, которую выражают в процентах по отношению к необлученному контролю.

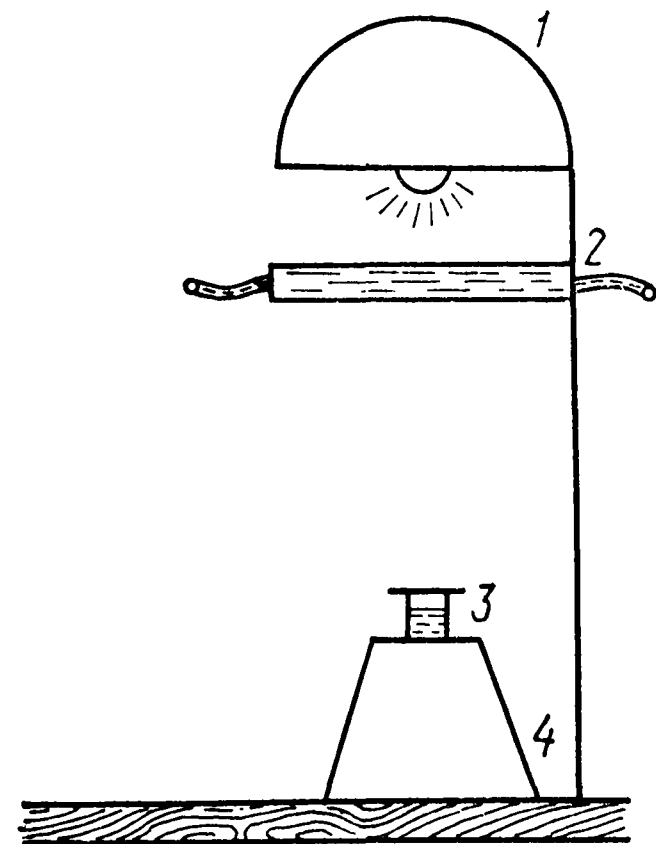


Рис. 123. Схема установки для изучения действия света на грибы:

1 — лампа накаливания в кожухе, укрепленная на держателе; 2 — водный фильтр (водное охлаждение); 3 — освещаемый образец (суспензия конидий гриба); 4 — магнитная мешалка.

2. Выживаемость спор определяют после облучения последовательно увеличивающимися дозами УФ-лучей и дальнейшего освещения их одной определенной дозой видимого света [713, 763]. Способность к фотореактивации является таксономическим признаком, достоверным на уровне рода [763].

Темновое восстановление облученных одной дозой спор состоит в выдерживании суспензии конидий в воде при температуре 25—27° С в течение 10, 20, 40, 60 мин и 2, 3, 4, 6, 24 и 48 ч. Выживаемость конидий, высеянных через указанные промежутки времени, по сравнению с выживаемостью необлученных конидий служит показателем темновой репарации. Количественные данные, полученные при изучении фоторе-

активации и темновой репарации, обрабатывают статистически. Результаты выражают также графически в полулогарифмическом масштабе [153].

XVI.3. ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

Ионизирующие излучения в качестве экстремального и мутагенного факторов воздействия находят широкое применение в селекционной работе, при изучении радиочувствительности организмов и их радиозащитных реакций.

XVI.3.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Согласно современным представлениям все виды ионизирующих излучений можно разделить на корпускулярные и электромагнитные [95, 113, 120, 137]. Корпускулярное излучение включает группу легких элементарных частиц — электронов и позитронов — и тяжелых частиц — протонов, α -частиц, нейтронов; к электромагнитным относятся рентгеновское (X) и гамма (γ)-излучения.

Электромагнитное излучение занимает область волнового спектра длиной 20—0,001 Å, область рентгеновских лучей расположена в пределах 0,06—20 Å, γ -лучей — от 1 Å и меньше. Рентгеновские и γ -лучи имеют квантовую природу. Энергия кванта УФ-света равна 3 эВ, рентгеновских лучей, применяемых для диагностики, — 30 кэВ, гамма-квантов ^{60}Co — 1,16 и 1,33 МэВ. С уменьшением длины волны энергия квантов возрастает, что выражается зависимостью $E = 12400/\lambda$ эВ, где λ — длина волны (Å).

Физические свойства X - и γ -лучей и, что особенно важно, их биологическое действие на живые организмы одинаковы. При воздействии этих видов излучения на вещество энергия последнего, поглощенная живой тканью, распределяется в ней неравномерно. В результате можно наблюдать три основных эффекта — комптоновский, фотоэлектрический и образование пар электронов [120, 229, 486].

Ввиду того что указанные виды излучений вызывают образование ионов в среде, подвергшейся облучению, они называются ионизирующими излучениями.

XVI.3.2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА ГРИБЫ

XVI.3.2.1. ИСТОЧНИКИ ИЗЛУЧЕНИЯ, ПОГЛОЩЕННАЯ ДОЗА ОБЛУЧЕНИЯ, ЕДИНИЦЫ ЕЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Источником α -частиц обычно служит радиоактивный Po . Нейтронное излучение, будучи результатом некоторых ядерных реакций, как правило, получают в атомных реакторах. γ -кванты испускаются в ходе ядерных реакций и при распаде многих радиоактивных веществ. Энергия γ -лучей, образующихся при распаде разных радиоактивных веществ, различна и достигает значений от десятков тысяч до миллионов электрон-вольт. Для научно-исследовательской работы и в медицинской практике в качестве источника γ -квантов применяют ^{60}Co , X -лучи получают в

ионизационной трубке, откаченной до глубокого вакуума, источником электронов в которой служит вольфрамовая спираль.

Единицей измерения дозы X- и γ -излучений является 1 рентген — количество излучения, при котором в 1 см³ воздуха образуется $2,1 \times 10^9$ пар ионов, несущих заряд в одну электростатическую единицу количества электричества любого знака. Единицей поглощенной дозы является 1 рад, равный поглощению 1 г облучаемой среды 100 эрг энергии. Под мощностью, или интенсивностью, дозы подразумевается количество энергии излучения, поглощаемое в единицу времени.

Более подробные сведения о дозе облучения, единицах ее измерения, физико-химических основах радиобиологии, биологическом действии излучений можно получить в специальных руководствах [120, 229, 483, 486 и др.].

Дозиметрия ионизирующих излучений осуществляется лицами со специальной подготовкой. Для работы в реакторах (нейтронное излучение), с радиоактивным полонием (α -излучение), электромагнитными излучениями (γ - и рентгеновские излучения) необходимо знакомство с режимом работы соответствующих установок и строжайшее выполнение норм и требований службы защиты.

XVI.3.2.2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОБЛУЧЕНИЯ ГРИБНЫХ СПОР

Общепринятым методом облучения грибных спор для получения дозной кривой выживаемости является облучение стандартизованной взвеси спор в воде. Как правило, наиболее удобна для облучения взвесь $1 \cdot 10^6$ спор/мл [161, 230], однако часто используют более концентрированные суспензии [495, 570]. Особенно это относится к бактериальным культурам. Что касается грибов с более крупными спорами, то для них вполне приемлема концентрация $1 \cdot 10^6$ спор/мл, а для видов родов *Alternaria*, *Stemphylium*, *Helminthosporium* и других, образующих крупные многоклеточные конидии, — $5 \cdot 10^5$ конидий/мл [158].

Для облучения готовят водную стандартизованную суспензию спор грибов (например, $1 \cdot 10^6$ клеток/мл) так, как описано в разделе XVI.2.3.5. Для этого используют культуры исследуемых штаммов грибов в известной фазе роста, выращенные на поверхности суслового агара. Обычно облучение проводят, когда гриб находится в начале стационарной фазы роста, но в ряде случаев, в зависимости от задач эксперимента, облучение ведут на разных этапах экспоненциальной фазы роста. По 4 мл приготовленной суспензии разливают в биологические пробирки диаметром 18 мм и каждую из них одновременно облучают определенной дозой γ -лучей. Обычно применяют несколько (8—14) последовательно увеличивающихся доз облучения. Облученные суспензии спор (по возможности немедленно) высевают в чашки Петри в соответствующих разведениях или, в зависимости от дозы γ -облучения, без разведения. Степень разведения для каждой культуры подбирают эмпирически. Для достоверности учета количества выживших спор рекомендуется выращивать в чашке Петри не более 100 колоний. Следовательно, при облучении взвеси $1 \cdot 10^6$ конидий/мл необходимо высевать четвертое разведение [211]. Затем чашки Петри заливают расплавленным и охлажденным до 30—40° С суловым агаром. Каждый облученный образец высевают не менее чем на 3—5 чашках Петри. Посевы термостатируют при $25 \pm 2^\circ$ С в течение 7—14 сут и учитывают количество выросших макроколоний. Если для посева использовали разведения суспензии, необходимо произвести пересчет количества выросших макроколоний на соответствующее разведение.

Стандартизованную взвесь спор можно облучать и в жидкой питательной среде [255]. Облучение спорового материала β - и α -лучами, проникающая способность которых невелика, осуществляют только в сухом состоянии на соответствующей подложке, что позволяет исключить влияние на облучаемые тесты продуктов радиолиза воды [159, 672]. Подробно модификация этого метода описана в разделе XVI.2.3.5. В некоторых случаях (например, для более детального изучения радиоустойчивости) применяют метод непрерывного облучения растущей культуры [161].

Кроме чистых культур грибов в лабораторных условиях облучают естественные субстраты, главным образом зерно, овощи, фрукты с находящимися в них микроорганизмами. Знание пределов устойчивости таких микроорганизмов, в том числе грибов, необходимо для рекомендаций по стерилизации и увеличению сроков хранения продуктов питания.

Сведения об облучении ионизирующей радиацией почвы весьма немногочисленны. Наиболее распространен метод облучения образцов различных типов почв разными дозами γ -лучей с последующим выделением из них культур грибов [205, 636, 744, 769, 781]. В результате получают данные о степени радиоустойчивости разных групп микроорганизмов. Кроме того, γ -облучение используют в качестве селективного фактора для подавления быстрорастущих грибов и выявления новых, редко встречающихся или специфических видов [636]. Предложена модификация этого метода, позволяющая подавлять развитие быстро- и широко-растущих представителей порядка *Mucorales* и семейства *Mucedinaceae*, стимулировать развитие видов родов *Aspergillus* и *Fusarium*, не изменяя видового состава темноцветных гифомицетов. Для этого почвенную суспензию в разведении 1 : 10 разливают в пробирки (по 5—8 мл) и облучают при постоянной интенсивности дозой γ -лучей 100 крад. Посев облученных почвенных суспензий производят методом разведений [211], применяя разведение на 1—2 порядка меньше, чем при посеве необлученных почвенных образцов.

XVI.4. ПОНЯТИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ, КРИТЕРИИ

Дозы, вызывающие гибель разных организмов, значительно различаются. Каждый организм характеризуется уровнем чувствительности к действию ионизирующей радиации, или радиочувствительностью. Необходимо заметить, что должна быть предельная четкость в интерпретации этого термина, под которым следует понимать поражаемость изучаемых объектов [486]. Альтернативой радиочувствительности служит понятие радиоустойчивости, или радиорезистентности. На радиоустойчивость микроорганизмов влияют физиологическое состояние облучаемых клеток, интенсивность дозы облучения, состав воздушной среды, в которой находятся клетки при облучении, температура культивирования, состав питательной среды, наличие радиозащитных веществ и пр. [158, 161, 592 и др.].

Для оценки радиочувствительности организма и сравнения радиочувствительности разных организмов первостепенное значение имеет выбранный критерий. Наиболее общим показателем является изменение выживаемости организма в зависимости от заданной дозы облучения [161, 230, 261, 432, 463, 486]. В радиобиологических исследованиях широко применяют графическое выражение зависимости выживаемости организмов от действия диапазона заданных доз, или дозная кривая выжи-

ваемости. Кроме этого критерия часто используются величины $ЛД_{37}$ и $ЛД_{50}$. Доза $ЛД_{37}$ называется средней летальной дозой и характеризует дозу облучения, при которой выживает 37% исходного количества клеток. Эта величина не случайна, а определяется соотношением $N/N_0 = 1/e \approx 0,377$, или 37%, где N — количество оставшихся живых клеток; N_0 — количество клеток до облучения; e — основание натуральных логарифмов, равное 2,718. Величина $ЛД_{50}$ соответствует дозе облучения, вызывающей гибель 50% объектов. Применяют также (в основном в опытах на животных) дозу $ЛД_{50}^{30}$, т. е. дозу, летальную для половины облученных объектов при наблюдении за результатами в течение 30 дней, дозы $ЛД_{90}$ и $ЛД_{99}$, при которых погибают соответственно 90 и 99% облученных клеток, а также сублетальные и летальные дозы [34, 88, 154, 217, 417]. Например, сублетальной считается такая доза, при которой выживаемость облученных спор (т. е. способность их образовывать макроколонию при последующем посеве) составляет 0,01—0,001% от контроля — необлученных конидий (на примере видов семейства *Dematiaceae* [154]). Виды этого семейства, радиоустойчивость которых на уровне сублетальной дозы превосходит 500 крад, отнесены к радиоустойчивым, а к радиочувствительным — виды, у которых значения сублетальной дозы составляют 400 крад и ниже.

Аналогичным образом критерием устойчивости к УФ-излучению для тех же видов принята выживаемость их после облучения дозой порядка $400 \cdot 10^3$ эрг/см², или 400 Дж/м², что соответствует состоянию стабильной устойчивости облучаемой клеточной популяции. Виды, выживаемость которых в этих условиях составляет 1% и выше, относятся к УФ-устойчивым, а 0,01% и ниже — к УФ-чувствительным. Показателем радиочувствительности фитопатогенных объектов может служить степень поражения растения, определяемая по принятой шкале [788].

XVI.4.1. ПОСТРОЕНИЕ ДОЗНЫХ КРИВЫХ ВЫЖИВАЕМОСТИ

Для построения дозных кривых выживаемости данные о количестве выросших макроколоний из облученной суспензии спор обрабатывают статистически с определением среднего квадратичного отклонения и доверительных интервалов [251] и выражают в процентах по отношению к числу макроколоний, образовавшихся из необработанных конидий (контроль). На оси абсцисс откладывают значения доз облучения в линейном масштабе, а на оси ординат — выживаемость облученных клеток в процентах. От каждой точки на графике, соответствующей выживаемости гриба при определенной дозе, вверх и вниз наносят доверительные интервалы, через которые и проводят искомую кривую выживания. Принято откладывать логарифм процента выживаемости, т. е. график строят в полулогарифмической системе координат. Такое построение позволяет, во-первых, нанести большой диапазон значений выживаемости (от 100 до 0,001% и менее) и, во-вторых, облегчает математический анализ дозных кривых [173, 229, 478].

При построении дозной кривой выживаемости большое значение придается правильной статистической обработке полученных данных. Рекомендуется ставить опыты в 4—10 повторностях, применяя одни и те же дозы [173]. При таком подходе дозная кривая выживаемости строится по нескольким десяткам экспериментальных точек. Например, при облучении 10 дозами в пяти повторных опытах получают 50 точек. Кроме того, рекомендуется при обработке данных вычислять не среднее ариф-

метическое, что обычно встречается в большинстве исследований, а среднее геометрическое значение, т. е. антилогарифм среднего из логарифмов процента выживаемости. Иногда дозные кривые строят по методу наименьших квадратов [448], который довольно сложен и применяется обычно на начальных стадиях работы, когда необходимо определить тип полученной кривой.

XVI.4.2. ТИПЫ ДОЗНЫХ КРИВЫХ ВЫЖИВАЕМОСТИ

В большинстве случаев наблюдается три типа кривых выживаемости — экспоненциальная, сложная экспоненциальная и сигмоидная, или S-образная [157, 173, 255, 257, 492, 499, 604, 742]. Выживаемость устойчивых к действию УФ- или ионизирующей радиации видов грибов описывается кривыми сигмоидного типа (плечо различной ширины, переходящее в относительно прямолинейный участок кривой), чувстви-

Рис. 124. Дозные кривые выживаемости после γ -облучения:

1 — экспоненциальная; 2 — сложная экспоненциальная с резистентным участком; 3 — сигмоидная.

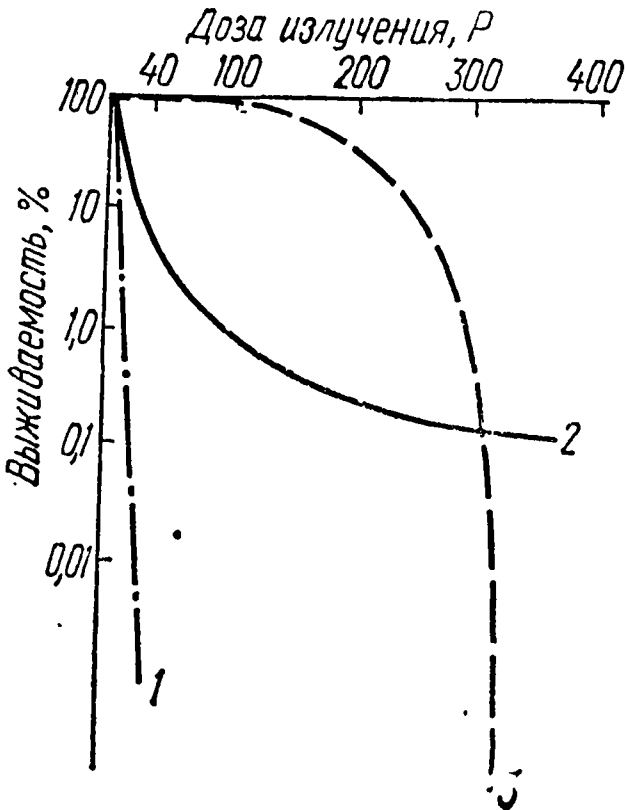
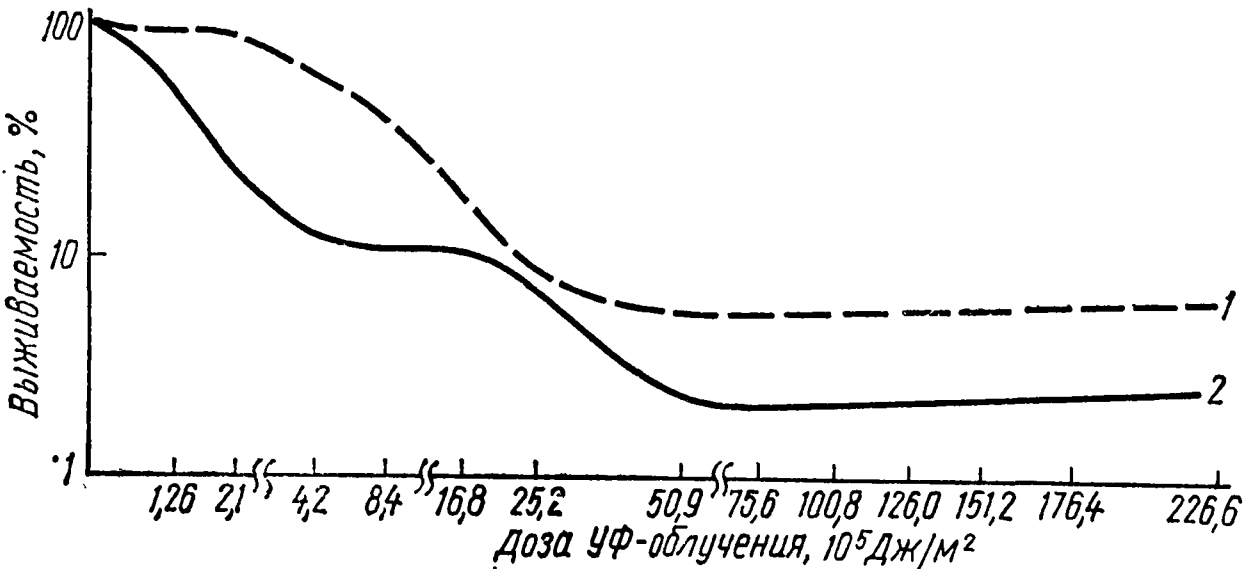


Рис. 125. Дозные кривые выживаемости после УФ-облучения:

1 — трехкомпонентная (сложная сигмоидная); 2 — многокомпонентная.



тельных видов — кривыми экспоненциального типа (прямая в полупологарифмической системе координат) и видов, занимающих промежуточное положение по устойчивости,— сложными экспоненциальными кривыми, состоящими из двух кривых, расположенных под определенным углом друг к другу (рис. 124). Выживаемость высокоустойчивых к УФ-лучам конидий грибов семейства Dematiaceae описывается кривыми трехкомпонентного типа [155, 673]. Правильнее было бы назы-

вать такую кривую сложной сигмоидной кривой выживаемости (по аналогии со сложной экспоненциальной кривой). В последнее время под действием света высокой интенсивности получены кривые выживаемости многокомпонентного типа (рис. 125), у которых выявлены 2—3 плато резистентности на последовательно уменьшающихся уровнях выживаемости, не обнаруживаемые ранее у микроорганизмов и грибов [155].

Наиболее общие сведения о дозах кривых выживаемости (их построении, интерпретации и пр.) приведены в работах [173, 478, 486].

XVI.5. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ

При изучении влияния ионизирующих излучений на биологические объекты необходимо учитывать явление пострadiaционного восстановления от полученных организмом повреждений. Это сложный, многоступенчатый процесс, осуществляющийся на всех уровнях биологической организации [161, 230, 343].

XVI.5.1. МЕТОД ОДНОКРАТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Способность клеток к пострadiaционному восстановлению от полученных повреждений определяют после однократного облучения методом, предложенным В. И. Корогодиным [230], который заключается в том,

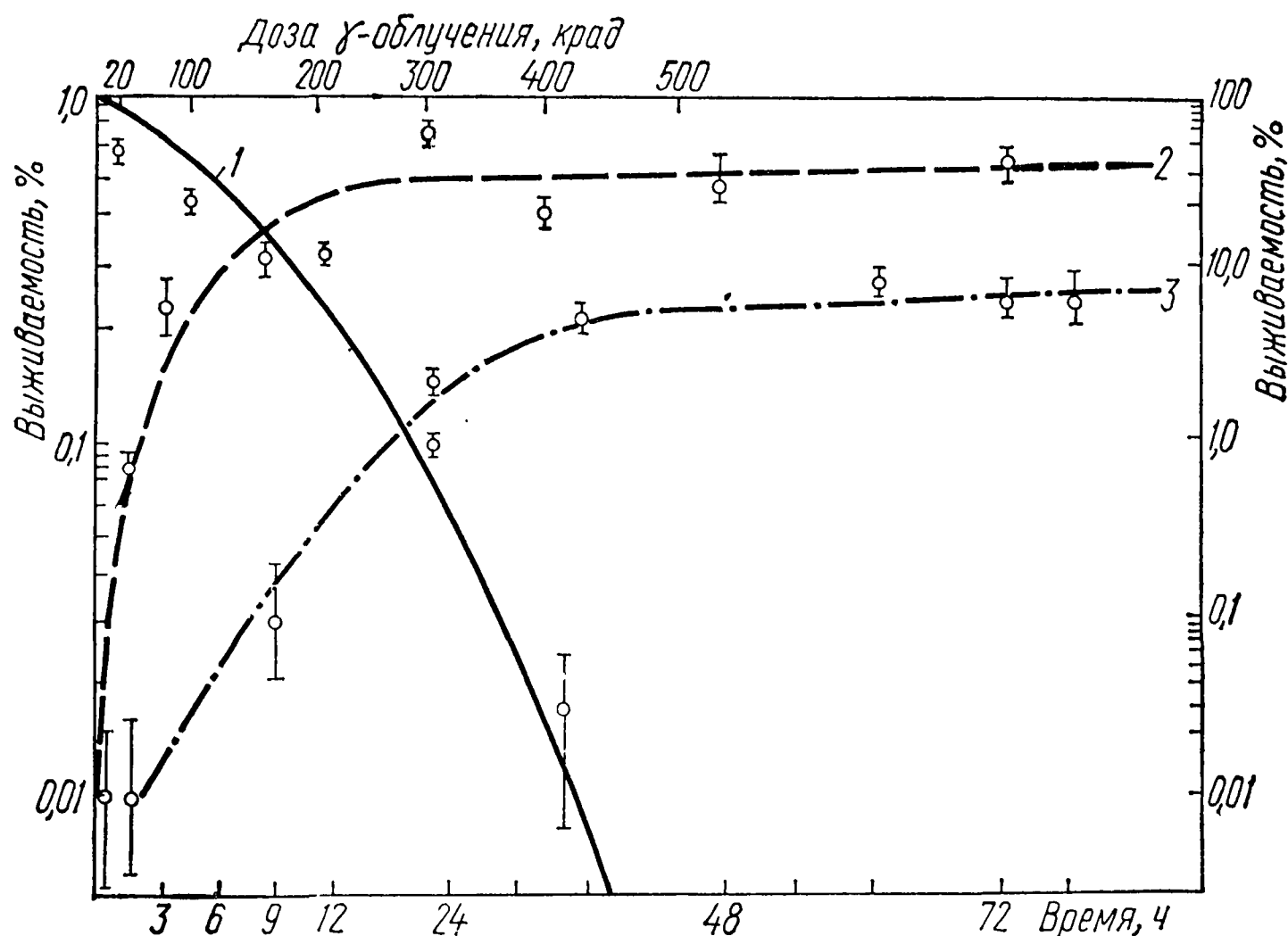


Рис. 126. Кривые выживаемости и пострadiaционного восстановления *Cladosporium cladosporioides*:

1 — дозовая кривая выживаемости после γ -облучения; 2 — восстановление после фракционированного облучения дозами $200 + 200$ крад; 3 — восстановление после однократного облучения дозой 400 крад; $\bar{x}$ — доверительные интервалы.

что суспензию клеток после однократного облучения заданной дозой выдерживают в воде при комнатной температуре (или инкубируют при определенной температуре в термостате) с последующим высевом на сусловый агар через разные промежутки времени. Как правило, для этого по известной для данного вида дозной кривой выживаемости определяют дозу, соответствующую LD_{90} или LD_{99} , и облучают ею 10—20 пробирок стандартизированной водной суспензии конидий. Посев обычно ведут немедленно после облучения и затем после выдерживания в воде в течение 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 48 и 72 ч. Посев можно производить и в другие сроки. Если пострadiaционное восстановление имеет место, уже через 1—2 ч выдерживания в воде выживаемость облученных конидий увеличивается и по мере дальнейшего выдерживания продолжает расти до определенного для каждого вида уровня, а затем переходит в стационарное состояние. Графически в полулогарифмическом масштабе этот процесс описывается кривой восстановления (рис. 126). При оценке способности к пострadiaционному восстановлению клетки не должны прорасти и сбиваться в комочки (конгломераты). Поэтому необходим постоянный микроскопический контроль конидий.

XVI.5.2. МЕТОД ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Этот метод применяют в том случае, когда известно, что зависимость выживаемости клеток от дозы облучения описывается кривой сигмоидного типа [279]. В основе метода лежит фракционирование дозы на две полудозы с разной экспозицией (от 1 мин до 48—72 ч) клеток в воде до облучения второй полудозой [279]. Экспозицию подбирают для каждой культуры индивидуально [88, 153]. Приготовление взвеси спор для облучения источниками ионизирующего излучения не отличается от описанного в разделе XVI.2.3.5. Критерием пострadiaционного восстановления является способность спор образовывать макроколонии, выраженная в процентах к контролю.

XVII. МЕТОДЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

XVII.1. ЗАДАЧИ И УСЛОВИЯ РАБОТЫ

Основными задачами медицинской микологии являются: изучение морфологии и биологии патогенных грибов, их идентификация; диагностика, эпидемиология и профилактика грибковых заболеваний (микозов).

XVII.1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОЗОВ И ИХ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ

Среди микозов человека различают поверхностные заболевания (кожи, ногтей, волос и слизистых покровов) и заболевания внутренних органов (селезенки и печени, легких, головного мозга, костей и суставов, лимфатической и кровеносной системы), а также микогенные сепсисы с распространением грибов по всему организму [200].

По течению микозы подразделяют на острые (недели!) и хронические (годы и десятилетия!), легкие и тяжелые, одиночные и эпидемические, а также особо опасные — эндемические, поражающие почти всех соприкасающихся с их возбудителями [203]. При некоторых микозах закономерны повторные приступы (рецидивы), развитие повышенной чувствительности (сенсibilизация) и продолжительное носительство грибов у переболевших.

Клинические проявления микозов весьма разнообразны. Некоторые из них напоминают бактериальные, особенно туберкулез, и вирусные инфекции, хронические протозойные болезни, злокачественные заболевания крови и опухоли [199]. Вероятность развития грибковых заболеваний возрастает в связи с существованием большой группы условно-патогенных грибов, для развития которых в организме нужны благоприятные условия: нарушения обмена веществ, различные ферментопатии, гормональные расстройства, иммунодефицитность, недостаток витаминов, изнурительные инфекционные и злокачественные болезни и т. д.

XVII.1.2. ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗОВ И УСЛОВИЯ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Среди возбудителей грибковых заболеваний человека встречаются представители зигомицетов (*Mucorales*, *Entomophthorales*), аскомицетов (*Hemiascomycetes*) — дрожжи, дрожжеподобные грибы, плектомицетов (*Plectomycetes*) — аспергиллы, пенициллы, некоторые дерматофиты.

Большинство патогенных грибов имеет септированный мицелий диаметром 2—5 мкм и споры различной формы и размера, служащие для размножения, сохранения и распространения грибов. Они бывают круглыми или прямоугольными, одно- или многоклеточными, бесцветными или окрашенными в разные цвета. По происхождению их подразделяют на бластоспоры и артроспоры, хламидоспоры, макро- и микроконидии [51, 201]. Многим патогенным грибам свойственно существование в двух морфологических формах: тканевой — паразитарной и в культуре — морфологически более разнообразной.

Для работы с патогенными грибами требуются предметные и покровные стекла, стерильные градуированные и пастеровские пипетки, предметные стекла с углублением, шлифованные стеклянные кольца (10 × 2 × 6 мм), металлическая петля и лопаточка, препаровальные иглы, шприцы с набором иглол, стерильные пробирки и чашки Петри, спиртовка, УФ-лампа с фильтрами для лучей Вуда, иммерсионный микроскоп, свежие питательные среды, стерильный физиологический раствор и дистиллированная вода.

Необходимые реактивы: 1) 30%-ный раствор КОН; 2) 96%-ный этанол; 3) смесь спирта (25 мл) с глицерином (25 мл) в воде (50 мл); 4) 10%-ная серная кислота; 5) лактофенол (жидкость Амана): 10 мл кристаллического фенола, 10 мл молочной кислоты, 20 мл глицерина, 10 мл воды (в темных флаконах); 6) хлораллактофенол: 4 г хлоралгидрата, 4 г фенола, 2 г молочной кислоты, 1 г салицилата натрия; 7) жидкость Пинуа: 10 г хлоралгидрата, 5 г глицерина, 5 мл воды, 2,5 мл 2%-ного раствора уксуснокислого свинца.

Красители: 1) синий лактофенол: 0,04 г сини (C₄B), 10 мл лактофенола; 2) карболовый генциановый фиолетовый; 3) карболовый фуксин; 4) водный фуксин для докраски по Граму; 5) водная синь для окраски по Цилю — Нильсену; 6) уксуснокислая синь: 100 мл воды, 0,05 г сини (C₄B), 3 мл кристаллической уксусной кислоты; 7) фиксирующая жидкость по Буину: 300 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, 100 мл 40%-ного раствора формалина, 20 мл ледяной уксусной кислоты; продолжительность фиксации 1—3 дня; 8) растворы дезинфицирующих веществ: 5%-ный фенол, 10%-ный хлорамин; 9) вазелиновое масло, твердый парафин [361].

Работа с живыми патогенными грибами в лаборатории требует большой четкости и осторожности. Пересевы следует проводить в чистых боксах, заражение животных — в отдельных помещениях, выращивание — в специальных термостатах с оптимальной для развития гриба температурой. Остатки патологического материала, неиспользованные культуры грибов, загрязненная грибами посуда и пипетки автоклавируют в специальных боксах. Отработанные препараты погружают в 10%-ный раствор хлорамина и тщательно промывают после кипячения. Разбитые пробирки и другую посуду с живыми культурами грибов сразу же дезинфицируют 5%-ным фенолом или 10%-ным хлорамином в течение часа с последующей влажной уборкой помещения дезинфицирующими средствами и УФ-облучением стен и воздуха помещений в течение 1—1,5 ч.

Загрязненные живыми грибами руки моют с мылом, протирают спиртом и тщательно ополаскивают водой. При травматическом повреждении кожи, порезах, попадании заразного материала на слизистую глаз немедленно проводят лечебно-профилактические мероприятия.

XVII.2. СБОР, ОБРАБОТКА И ПЕРЕСЫЛКА МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

XVII.2.1. ИЗОЛЯЦИЯ ГРИБОВ ИЗ ПОРАЖЕННЫХ ТКАНЕЙ

Для выявления грибов применяют наложение на очаг поражения на 3—4 дня влажной повязки: стерильный слой марли или ваты, асептично пропитанной физиологическим раствором, под компрессной бумагой и ватой. Добавление к физиологическому раствору антибиотиков благоприятствует получению чистых культур патогенных грибов.

Очаги поражения предварительно обрабатывают сначала губкой, смоченной 70%-ным спиртом, затем водой с мылом для удаления грязи и медикаментов, препятствующих микроскопии патологического материала. Кожные чешуйки берут с периферии очагов поражения как более свежие и богатые мицелиальными элементами.

По методике Биттинга и Биссерта на очаг поражения, обработанный ацетоном, наносят несколько капель гамма-цианакрилового контактного цемента и плотно покрывают стеклом. Приблизительно через 30 с стекло снимают, на нем остается несколько пластинок клеток рогового слоя, иногда и плотно приставшие волоски. Препарат исследуют в капле 10%-ного раствора щелочи или окрашивают синим лактофенолом. Волосы извлекают пинцетом, чешуйки кожи собирают скальпелем, ногтевые чешуйки — ланцетом и препаровальными иглами. Для взятия, окраски и микроскопии грибов применяют прозрачную липкую ленту. Препараты пригодны для длительного хранения.

Для отбора пораженных волос с успехом используют лампу Вуда, в лучах которой в темном помещении легко выделяются даже при бессимптомных поражениях светящиеся волоски — наиболее подходящий материал для исследования [51, 201]. Яркое свечение волос человека шерсти и когтей домашних животных наблюдается при поражении микроспоридиями, слабое свечение беловато-зеленоватого цвета — при фавусе, золотисто-желтое — при разноцветном лишае, розовато-красноватое — при эритразме. Возбудители трихофитии не дают свечения ни в культурах, ни в патологическом материале.

При заборе патологического материала с поверхности кожи прикладывают или протирают очаги поражения волосистой щеткой, небольшим лоскутом вельвета или ковровой материи с последующим прикосновением их к поверхности питательных плотных сред в чашках Петри. При этом используют стерильную щетку для мытья рук, на которую нанизывают кусочек марли на глубине 0,3—0,4 см в качестве своеобразного фильтра для патологического материала. После прикосновения к поверхности очагов поражения щеткой делают легкие отпечатки на агаровой среде в чашках Петри. Снятый после этого марлевый слой прикладывают к поверхности агаровой среды в другой чашке Петри [364]. Модифицированной щеткой пользуются для забора материала не только с кожных покровов человека и животных, но и с предметов внешней среды.

Кровь асептично собирают в пробирки с раствором лимонно-кислого натрия или со стеклянными бусами и встряхивают для предохранения от свертывания.

Асептично взятую посредством поясничного прокола (пункции) спинномозговую жидкость центрифугируют; осадок используют для

посева и микроскопии в окрашенных тушью и неокрашенных препаратах.

Гной собирают ватным тампоном на палочке или петлей, из свищей — пастеровской пипеткой, из закрытых очагов и абсцессов — шприцем, из глубоких очагов — посредством биопсии (вырезывания небольшого кусочка ткани). Взятие материала из бронхов осуществляют с помощью бронхоскопии, путем аспирации или посредством биопсии очагов поражения.

Промывные воды бронхов, желудка, желчь и мочу предварительно центрифугируют. Разведенный физиологическим раствором с антибиотиками (1 : 1) осадок микроскопируют непосредственно или в окрашенных по Граму и тушью препаратах.

XVII.2.2. ХРАНЕНИЕ И ПЕРЕСЫЛКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И КУЛЬТУР

Патологический материал и культуры грибов пересылают в другие лаборатории, соблюдая меры предосторожности для предотвращения заражения грибами соприкасающихся с ними лиц и сохранения материала пригодным для исследований. Чешуйки и волосы могут долго храниться и пересылаться без повреждения в чистой бумаге, свернутой в конвертики аптечного типа. Жидкий материал (кровь, спинномозговую жидкость, осадок мочи, мокроту, испражнения и т. д.) консервируют раствором антибиотиков и пересылают в запаянных ампулах. Испражнения предварительно разводят физиологическим раствором (1 : 10), содержащим помимо 500 ед. пенициллина 500 мкг стрептомицина и 500 мкг хлоромидетина на 1 мл взвеси испражнений. Биопсированные ткани и трупный материал для посева пересылают в растворах антибиотиков, а для гистологического исследования — в 10%-ном растворе формалина во флаконах, закрытых резиновыми пробками. Дефибрированную кровь направляют для посева в стерильных ампулах, а для микроскопии — в тонких мазках или в виде толстой капли на стекле, зафиксированных 96%-ным этанолом до высыхания. Гной из свищей, отделяемое язв и т. п. собирают стерильным ватным тампоном на палочке, увлажненным раствором антибиотиков, и направляют в стерильных пробирках, плотно закрытых ватными пробками.

Культуры грибов пересылают на агаровых средах в пробирках или флаконах, на целлофане или замороженные лиофильно в ампулах. Из-за опасности быстрого высыхания, почти постоянного боя и возможности заражения нельзя пересылать культуры на жидких средах и в чашках Петри.

Сопроводительная надпись к патологическому материалу должна содержать следующие данные: фамилию врача и адрес учреждения, где обслуживается больной, фамилию и адрес больного, номер истории болезни, возраст, профессию; краткие сведения о начале и развитии болезни, результатах предварительных исследований и предполагаемый диагноз.

ХVII.3. МИКРОСКОПИЯ ГРИБОВ В НАТИВНЫХ И ОКРАШЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

ХVII.3.1. ПОДГОТОВКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выявления грибов патологический материал исследуют как неокрашенным (сухая микроскопия), так и обработанным различными красителями (иммерсионная микроскопия). Ногтевые и кожные чешуйки, гнойные корочки и пораженные волосы предварительно размельчают препаровальной иглой на середине предметного стекла, обрабатывают 30%-ным раствором щелочи (NaOH, KOH) для мацерации и просветления, слегка подогревают на спиртовке до появления белого ободка из выпадающих кристаллов и исследуют под покровным стеклом.

Для ускорения индикации грибов в исследуемых кожных и ногтевых плотных чешуйках (корочках) применяют метод обогащения, основанный на сочетанном воздействии более крепких растворов щелочи (40%-ных) и 5-кратного в течение часа кипячения в центрифужных пробирках. Осадок после центрифугирования промывают водой и исследуют в капле 10%-ного раствора KOH под покровным стеклом [361].

ХVII.3.2. ОКРАСКА ГРИБОВ ИЗ КОЖНЫХ И НОГТЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ

Для окраски грибов в кожных и ногтевых чешуйках используют синий лактофенол и уксуснокислую синь (0,05 мл метиленового синего, 3 мл кристаллической уксусной кислоты, 100 мл воды). Для выявления слизистых капсул грибов на предметное стекло наносят рядом (несоприкасающиеся) каплю взвеси исследуемых культур в физиологическом растворе и каплю китайской туши. Затем прокаленной петлей или лопаточкой растирают обе капли вместе и размазывают краем покровного стекла по предметному. Препарат фиксируют на пламени и окрашивают карболовым фуксином или генциановым фиолетовым. На черном фоне видны неокрашивающиеся (белые) капсулы вокруг окрашенных клеток гриба [200].

ХVII.3.3. ОКРАСКА ПО ГРАМУ И ЦИЛЮ — НИЛЬСЕНУ

Окраска по Граму. На фиксированный пламенем мазок жидкого патологического материала наливают через фильтровальную бумагу анилиновый или карболовый генциановый фиолетовый на 1 мин, покрывают раствором Люголя (без бумаги) на 1 мин, погружают для обесцвечивания в 96%-ный этанол на 30 с. Препарат промывают и докрашивают водным фуксином в течение 1 мин. При этом грамположительные клетки окрашиваются в фиолетовый, а грамотрицательные — в красный цвет.

Одновременная окраска по Цилю — Нильсену и Граму. Фиксированный на стекле над пламенем горелки мазок патологического материала покрывают карболовым фуксином и выдерживают 15—30 мин при 55° С. Затем промывают водой и 2%-ным раствором хлоргидрата анилина (несколько секунд); обесцвечивают погружением в 96%-ный этанол. После этого окрашивают карболовым генциановым фиолетовым

в течение 3 мин, покрывают раствором Люголя на 3 мин, снова промывают безводным этанолом и докрашивают в течение нескольких секунд 2%-ным светло-зеленым или пикрининдигокармином.

XVII.3.4. ОКРАСКА ПО РОМАНОВСКОМУ-ГИМЗА

Фиксированный спиртом препарат целиком погружают в водный раствор краски Романовского — Гимза (1—2 капли краски на 1 мл бидистиллированной воды) на 30—60 мин или дольше в зависимости от густоты мазка. Клетки грибов окрашиваются в розовато-фиолетовый цвет, хроматиновые включения — в красный, волютин — в темновато-фиолетовый.

Для выявления грибов используют также окрашивание флуоресцирующими веществами. Для этого нативные препараты покрывают свежеприготовленным раствором 20%-ного КОН с 1%-ным раствором акридинового оранжевого (в соотношении 9 : 1). Препараты исследуют с помощью флуоресцентного микроскопа. На синеватом фоне видны зеленовато-желтоватые септированные нити и бластоспоры. Грибы при этом выявляются довольно быстро; возможность смешать их с другими структурами невелика.

Различные методы окраски патогенных грибов в тканях описаны в соответствующих руководствах по микологии и гистологии грибных заболеваний [459].

XVII.4. ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Патологический материал, особенно жидкий и биопсированный, следует высевать как можно быстрее непосредственно после взятия. Для получения чистых культур грибов необходимо предотвратить бактериальное и плесневое загрязнение посевов, что достигается подбором соответствующих питательных сред и оптимальных условий (температуры, влажности, аэрации) для развития патогенных грибов и получения типичных культур.

Патологический материал и биопсированную ткань предварительно измельчают, гомогенизируют, растирая в смеси с растворами антибиотиков, выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре, освобождают фильтрованием через марлю от крупных частиц и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок исследуют микроскопически и вводят подкожно или внутрикожно мышам (по 0,5 мл) или интрастимуляционно самцам морских свинок, золотистым хомячкам (по 0,2 мл) и кроликам (по 0,3—0,4 мл).

Для получения чистых культур рекомендуется использовать посевы тонко размельченного или асептично разведенного патологического материала; возможно большее количество агаровых сред в пробирках или чашках Петри на одну пробу исследуемого материала; проводить пассажи загрязненного бактериями посевного материала через кислые среды (рН 2—3), в которых отмирает бактериальная флора.

Бактериальное загрязнение посевов устраняют с помощью антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, хлоромидетина) в смеси или отдельно, обрабатывая ими патологический материал и добавляя к соответствующим питательным субстратам. Для приготовления смеси из антибиотиков берут 5000 ед. пенициллина, 5000 мкг стрептомицина на 1 мл физиологического раствора. Смесь хранят в холодильнике. Хлоромидетин используется в концентрации 500 мкг/мл. По мере надобности

2 капли смеси наносят на косяки агара. Антибиотики легко диффундируют, создавая концентрацию около 50 ед. в 1 мл среды. Актидион (циклогексимид) в концентрации 500 мкг/мл плотной среды предохраняет посевы от заражения банальными видами грибов. Антибиотик термостабилен, его можно добавлять к горячей питательной среде. Из других бактерицидных средств используют теллурид калия (0,015%-ный), сульфат меди (0,05%-ный), кристалл-виолет (0,01%-ный); добавление к питательным средам фурацилина (1 : 50 000) и зет-фурана (1 : 100 000) задерживает развитие бактерий и актиномицетов. Медленно растущие патогенные грибы рекомендуют выращивать во влажной камере, в эксикаторе, под стеклянным колпаком в тарелках с комочком стерильной ваты или марли, периодически увлажняемых водой.

Для выявления патогенных грибов в испражнениях их исследуют после разведения физиологическим раствором с антибиотиками в соотношении 1 : 10. 5—6 комочков испражнений диаметром 0,5 мм берут с поверхности и из глубины, из передней и задней частей уплотненных испражнений и делают взвесь в физиологическом растворе с антибиотиками (1 : 100). Взвесь наносят по 0,05—0,1 мл на плотные питательные среды и осторожно растирают стеклянным шпателем по поверхности. Результаты учитывают количественно с пересчетом выявленных грибов на 1 г исследуемого материала и оценивают при сопоставлении с результатами повторных исследований.

Возбудителей кокцидиоза, гистоплазмоза выделяют из почвы с помощью заражения животных. Для этого навески почвы помещают в физиологический раствор с антибиотиками в соотношении 1 : 5—1 : 10 (масса : объем), встряхивают в течение 2 ч или оставляют на 24 ч при 37° С, после чего заражают восприимчивых животных посредством подкожной или внутрибрюшной инъекции. Животных убивают через 3—4 нед. Селезенку, печень, легкие используют для выделения чистых культур грибов.

ХVII.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ ИЗ ПОЧВЫ

ХVII.5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕРМАТОФИТОВ

Образцы почвы обычно из 10 точек исследуемого участка помещают в широкогорлые стеклянные стерильные банки емкостью 500 мл, накрытые половинкой чашки Петри. Почву берут с глубины 5—6 см металлическим шпателем, лопаточкой или крышкой от чашки Петри, высыпают в стеклянную банку, встряхивают для гомогенизации и насыпают слоем 3—5 мм на дно стерильных чашек Петри, увлажняют небольшим количеством (5—6 мм) стерильной воды. На поверхность почвы равномерно раскладывают детские или конские волосы, предварительно нарезанные отрезками длиной 2—3 см и автоклавированные при 120° С в течение 20 мин. Завернутые в бумагу чашки Петри сохраняют в темном месте при 20—25° С в течение 3—4 нед.

В положительных пробах на волосах развиваются бархатисто-мучнистые колонии кератиофильных грибов с беловатыми зернами клейстотетций (половые формы грибов) размером 0,5—1 мм. Для освобождения волосков от комочков земли их рекомендуется проводить по поверхности агаризованной воды (4%-ной) в чашках Петри, меняя чашки для каждой пробы, и после этого высевать их на косяки агара Сабуро или сусло в пробирках [201].

XVII.5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БЛАСТОМИКОЗОВ

Для выделения возбудителей бластомикозов навеску почвы (5—10 г) обрабатывают 30%-ным раствором хлористого натрия, взвесь отстаивают в течение 3—4 ч, надосадочную жидкость разводят в 1,5—2 раза стерильной водой, центрифугируют, осадок обрабатывают раствором антибиотиков, высевают на питательные среды и используют для заражения восприимчивых животных. Для непосредственного выделения возбудителей респираторных микозов из почвы используют восприимчивых мышей, помещая их на 7 дней в сосуд, содержащий размельченную почву. Мышей убивают через 4 нед, из печени, селезенки, легких делают посевы для получения культур и последующего их определения [203].

Получение одноклеточных культур. Маленький комочек чистой культуры гриба основательно размешивают в стерильном физиологическом растворе. Последовательно разводят в ряде пробирок, содержащих 2—3 мл жидкого сусла, до более тонкой взвеси и последнюю пробирку на 3—5 ч помещают в термостат для прорастания клеточных элементов («освежение»). Затем берут стерильное предметное стекло с 4—5 каплями совершенно прозрачного сусло-желатина и в первую каплю вносят крупную петлю взвеси «освеженных» грибов на жидком сусле в пробирке. Из первой капли материал переносят в остальные, энергично размешивая их платиновой петлей, прожигаемой перед переносом материала в новую каплю. Материал из последних разведений кладут на стерильные покровные стекла, помещая капельки над углублением предметного стекла, и исследуют их под микроскопом. Каплю с одной клеткой отмечают, покровное стекло обмазывают вазелином и ставят в термостат для выращивания. Из «одноклеточной» колонии в дальнейшем делают высевы на плотные среды для получения чистых культур гриба.

Метод Топачио. Готовят целлофановые листочки размером 20 × 50 мм (несколько меньше обыкновенного предметного стекла), стерилизуют их в автоклаве или погружением на 10—20 ч в 96%-ный этанол. Приклеивают листочки к стерильному предметному стеклу агар-агаром или желатином, прокатывая по нему стерильную стеклянную палочку для создания равномерной поверхности. Затем на целлофановый листочек тонкой стеклянной палочкой с небольшим расширением на конце наносят два ряда маленьких капель взвеси гриба густотой 3—5 клеток в каждой. Быстро просматривают капли при малом увеличении микроскопа и там, где находят одну клетку, наносят небольшую каплю жидкой питательной среды для предохранения от высыхания. Затем тонким и острым скальпелем вырезают квадратик целлофана с этой каплей, из которой в дальнейшем обычным путем получают культуру на плотных средах [200].

XVII.6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

В процессе культивирования грибов необходимо строгое соблюдение постоянных условий: температуры и влажности, степени освещения (темнота!), свежести питательных сред, их кислотности [201, 401] (см. приложение 7).

XVII.6.1. МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ВИСЯЧЕЙ КАПЛЕ

На покровное стекло асептично наносят большую каплю жидкой питательной среды и кладут в нее маленький комочек культуры. Каплю подвешивают над стеклянным кольцом высотой 16, шириной 10, толщиной 3 мм, прикрепленным к предметному стеклу расплавленным парафином. Кольцо ставят во влажную камеру, помещают в термостат (25—30° С) и ежедневно наблюдают за развитием гриба. Вместо кольца используют стерильные предметные стекла с углублением.

XVII.6.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКЛАХ ПО РИВАЛЬЕ И ЗЕЙДЕЛЮ

Небольшой комочек культуры гриба высевают на предметное стекло, смоченное толстым слоем агаровой среды, и выращивают во влажной камере при 25—35° С. Через разные сроки, по мере надобности, их подсушивают в течение суток при 37° С, препаровальной иглой снимают центральный бугорок культуры и погружают препарат в раствор коллодия (коллодий — 1 ч, безводный этанол — 2 ч, серный эфир — 2 ч) и после быстрого стекания жидкости препарат оставляют мазком вниз на 24 ч при комнатной температуре или при 25° С в термостате для фиксирования мицелия и спор.

XVII.6.3. ВЫРАЩИВАНИЕ ГРИБОВ В ТОНКОМ СЛОЕ АГАРА НА СТЕКЛЕ

На стерильные предметные стекла наносят 3—5 капель расплавленной агаровой среды, дают агару равномерно распределиться по поверхности стекла и быстро поворачивают агаровым слоем вниз. После уплотнения агара в том же положении стекол делают тонкий штриховой посев гриба через всю поверхность агаровой среды. Стекла помещают на стеклянные трубочки, лежащие на дне стерильных чашек Петри во влажной камере посевом вниз. Препараты исследуют через день в сухой системе микроскопа, идентифицируя грибы по развитию мицелия и споруляции.

Для постоянного наблюдения за ростом грибов на стеклах и в висячих каплях используют специальные столики для микроскопа с электрическим нагревом, что позволяет изучать развитие грибов при разных температурах.

XVII.6.4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБОВ НА АГАРОВЫХ БЛОКАХ

Небольшой блок агаровой среды размером 10 × 10 × 3 мм асептично кладут на середину стерильного предметного стекла, засевают небольшим комочком или взвесью исследуемой культуры, покрывают стерильным покровным стеклом и выращивают во влажной камере. Нити гриба развиваются на агаровом блоке и на стеклах вокруг блока. После удаления агарового блока мицелиальный налет на стекле фиксируют 96%-ным этанолом, высушивают, покрывают подкрашенным синью лактофенолом. Затем покровное стекло кладут на предметное пре-

паратом вниз, а предметное покрывают чистым покровным стеклом, края стекол обмазывают лаком или растопленным парафином и исследуют обычным путем [149].

XVII.6.5. ДРУГИЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Окраска по Кондо — Шоу. Стерильные целлофановые диски перед употреблением смачивают стерильной дистиллированной водой и асептично накладывают на поверхность агаровой среды в чашки Петри. Чашки выдерживают в течение 48 ч в термостате для выявления возможного загрязнения, после чего засевают изучаемым грибом. Для обезвреживания грибных культур на целлофане их выдерживают в течение 30 мин над парами формалина, налитого на внутреннюю поверхность крышки от чашки Петри. Целлофановые диски с культурами можно исследовать на предметном стекле в спирте с глицерином, в синем лактофеноле. Для выявления аскоспор исследуемые грибы засевают на среду Городковой, на кукурузный агар, 2%-ный картофельный агар, 3%-ный (по Балингу) сусло-агар, морковь, а также на гипсовые блоки или кусочки красного кирпича, не полностью погруженные в стерильную водопроводную воду в чашках Петри.

Окраска аскоспор по Куферату. Препарат из взвеси культуры на предметном стекле подсушивают и фиксируют на пламени спиртовой горелки. Через фильтровальную бумагу окрашивают его в течение 2—3 мин карболовым фуксином Циля при периодическом кипячении, избегая высыхания раствора красителя. Препарат промывают водой, очищают края от фуксина, погружают в спирт, подкисленный 1%-ной соляной или 2%-ной молочной кислотой, обильно промывают водой, подкрашивают в течение 1 мин 1%-ным раствором метиленового синего, снова промывают водой и во влажном состоянии покрывают китайской тушью, каплю которой наносят пастеровской пипеткой в центр мазка. Зрелые аскоспоры окрашиваются при этом в красный цвет, аски выглядят белыми на черном фоне, вегетативные клетки принимают зеленовато-синеватую окраску.

Окраска аскоспор по Виртцу в модификации Шеффера — Фултона. Мазок взвеси исследуемых культур на стекле фиксируют на пламени, покрывают 5%-ным водным раствором малахитового зеленого, подогревают в парах на спиртовке и оставляют на 5—6 мин, 30 с промывают проточной водой и исследуют под иммерсией. Аскоспоры окрашиваются в зеленый, клетки грибов в красноватый цвет. Образование хламидоспор изучают на рисовом или морковно-картофельном агаре.

Для выделения ростковых трубок, свойственных *Candida albicans*, в свежую человеческую сыворотку (0,5 мл в пробирке) вносят несколько капель взвеси исследуемых грибов. Посевы выдерживают в термостате при 37° С в течение часа и исследуют без окраски в нативных препаратах при большом увеличении микроскопа.

Образование пигмента удобнее наблюдать при выращивании грибов в широких пробирках (18 × 150 мм), закрытых ватными пробками. Ограничение притока атмосферного кислорода приводит к потере пигментообразования.

Совершенные формы дерматофитов выделяют из почвы с помощью фрагментов стерильных детских или конских волос в качестве приманки. Клейстотеции в виде беловатых мучнистых зерен появляются на 20—30-й день при 20—25° С.

Музейные фиксированные культуры грибов на агаровых блоках. Из зрелой культуры гриба прокаленным скальпелем или лопаточкой

вырезают агаровый блок с отдельной колонией. Он должен быть довольно тонким, освобожденным от избытка агаровой среды, размером немного меньше покровного стекла. Блок помещают верхней поверхностью на покровное стекло и покрывают каплей 10%-ного раствора формалина. После того как формалин диффундирует в агар, излишек его удаляют фильтровальной бумагой и блок вместе с покровным стеклом переносят на предметное стекло. Пространство между стеклами заполняют монтирующей жидкостью (лактофенол, смесь этанола с глицерином), края заливают подогретым парафином. Препараты пригодны для наблюдения в течение 2—3 лет.

ХVII.7. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ И БИОЛОГИИ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

ХVII.7.1. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ

При характеристике культур патогенных грибов следует учитывать морфологию колонии и ее патогенность для животных. Необходимо также учитывать скорость и особенности развития грибов в культурах, возрастной полиморфизм, макро- и микроскопические признаки, появление секторов, вторичных и дочерних колоний, плеоморфных и фавиформных (строчковидных) изменений. При морфологической характеристике различных клеточных форм в культурах патогенных грибов учитывают размеры, форму, расположение и происхождение различных клеток, что существенно для идентификации гриба.

Для микроскопического изучения культуры лопаточкой берут небольшой круговой сектор колонии. В более старой, центральной зоне колонии преобладают крупные, богатые липидами хламидоспоры; в средних зонах — обильные макро- и микроконидии, артроспоры; в молодой периферической зоне — интенсивно ветвящиеся нити мицелия. Сравнительное изучение клеточных форм в разных участках одного сектора позволяет судить о возрастной изменчивости культуры, интенсивности спорообразования, наличии характерных видовых признаков [200].

ХVII.7.2. ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Биохимическую активность культур грибов оценивают по их способности к усвоению (ауксанограмма) и ферментации (зимограмма) азотистых веществ и углеводов. В качестве основной ферментационной среды используют 1%-ную дрожжевую или пептонную воду с добавлением 2% соответствующих углеводов и индикатора кислотообразования. Показателем брожения является покраснение жидкой среды (кислотообразование) и выделение углекислоты. Для улавливания углекислого газа в пробирки помещают стеклянный поплавок (стеклянную трубочку длиной 2—3 см) с запаянным верхним концом. Для определения ферментативной активности посевы грибов выдерживают при 30—35° С; результаты учитывают для дрожжеподобных грибов на 3-и сут, для нитчатых на 2—3-ю нед.

В качестве питательной среды для построения ауксанограммы углеводов используют (г): 1 фосфата калия; 0,5 сульфата магния; 2 промытого агара; 1000 мл дистиллированной воды; для построения ауксанограммы азота (г): 1 фосфата калия; 0,5 сульфата магния; 20 глюкозы;

2 промытого агара; 1000 мл дистиллированной воды. Навески агара в марлевом мешке предварительно промывают в течение 2 ч проточной водой и тщательно прополаскивают дистиллированной.

2 мл гомогенной взвеси чистых агаровых культур исследуемого гриба в физиологическом растворе наносят на дно стерильной чашки Петри, заливают расплавленной и охлажденной до 45° С агаровой средой, перемешивают осторожным покачиванием чашки Петри перед застыванием. На поверхность застывшей питательной среды наносят простерилизованные диски фильтровальной бумаги диаметром 5—6 мм, предварительно пропитанные 20%-ным раствором углеводов или исследуемых азотистых веществ и асептично высушенные в термостате.

Образование крахмалоподобных веществ выявляют на среде следующего состава (г): 1 сульфата аммония; 1 фосфата калия; 0,5 сульфата магния; 10 глюкозы; 200 мкг тиамина; 1000 мл дистиллированной воды; рН 4,5. К среде добавляют 25 г промытого агара, растворяют в автоклаве, разливают в пробирки и стерилизуют дробно при 100° С 3 дня подряд по 30 мин.

На скошенную поверхность питательной среды в пробирке засевают культуру исследуемого гриба и через 10—15 дней на поверхность ее наносят несколько капель раствора Люголя. При наличии крахмалоподобных веществ колония окрашивается в темно-синий цвет.

Для построения ауксаногаммы этанола используют среду, не содержащую других источников углерода (г): 1 сульфата аммония; 1 фосфата калия; 0,5 сульфата магния; 1000 мл дистиллированной воды; время стерилизации — 1 ч при 120° С. После охлаждения в среду добавляют не менее 3% этанола, 0,5% дрожжевого экстракта и несколько капель смеси витаминов (200 мкг биотина, 400 мкг пантотената кальция, 400 мкг ниацина, 2000 мкг инозитола, 200 мкг парааминобензойной кислоты, 400 мкг гидрохлоридпиридина, 400 мкг солянокислого тиамина). Отсутствие роста грибов в контрольной пробирке без этанола, при наличии колоний в опытных пробирках с этанолом, указывает на усвоение его исследуемой культурой.

Уреазную активность грибов изучают на среде Сеелигера и Литтмана, приготовленной следующим образом: 1) 28 г мочевины растворяют в 100 мл дистиллированной воды и стерилизуют через фильтр Зейтца; 2) к 900 мл воды добавляется 1 г пептона, 6 г хлористого натрия, 2 г монофосфата калия и 15 г агара; смесь кипятят до растворения агара; 3) к охлажденной до 55° С среде добавляют раствор мочевины и 6 мл красного фенола в разведении 1 : 500 (0,2 красного фенола, 10 мл слегка подогретого 96%-ного этанола при последующем добавлении 90 мл слегка подогретой дистиллированной воды); на поверхность среды, асептически разлитой в пробирки, засевают исследуемую культуру гриба. Выращивают при 25—30° С. Результаты учитывают через 2—3 сут для дрожжеподобных грибов, через 10—12 для нитчатых. При разложении мочевины среда окрашивается в розовый цвет [149, 200].

ХVII.7.2.1. ВЫРАЩИВАНИЕ ДЕРМАТОФИТОВ НА ВОЛОСАХ ПО ВЕНБРЕЙЗЕГХЕМУ

Здоровые волосы длиной 10—15 см прикрепляют коллодием к верхней части стеклянной трубочки, нижняя часть которой изогнута в виде треугольника, служит ей основанием. Едва заметный комочек колонии осторожным прикосновением наносят на середину волоска, после чего трубочку помещают в небольшой стеклянный цилиндр с крышкой, на дне которого находится стерильная вода для предохранения

посевов от высыхания, и выращивают при 25° С в течение 10—15 дней и больше. Инфицированные участки волосков исследуют в капле щелочи или лактофенола.

Выращивание грибов на стерильных волосах позволяет изучить кератинолитическую активность дерматофитов и своеобразных клиновидных морфологических структур, служащих для внедрения соответствующих грибов в волосы.

XVII.7.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБОВ

Кератинолитическую активность грибов определяют путем взвешивания небольших блоков кератина до и после заражения их соответствующими культурами грибов (по Гейтманеку) или же по характеру вызываемых грибами повреждений в волосе и количеству перфорационных органов.

XVII.8. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ЖИВОТНЫХ ГРИБАМИ

Методы экспериментального заражения и серологического исследования инфицированного организма для выявления специфических антигенов и антител являются основными этапами изучения развития инфекционного процесса. На них основано изучение свойств возбудителей грибных заболеваний, их патогенности и взаимного родства, выявления специфических защитных реакций организма. В лечебной практике с этими методами связана ранняя диагностика грибных заболеваний, выявление микогенной аллергии; при некоторых микозах их используют для прогнозирования течения и исхода болезни.

Патогенность грибов в культурах и патологическом материале определяют на разных видах лабораторных животных. Исследуемый материал перед заражением микроскопируют для характеристики клеточных форм и подсчета их количества в данной пробе. Молодые спорулирующие культуры грибов, богатые микроконидиями и бластоспорами, более пригодны для экспериментального заражения, чем зрелые и старые, которые нередко претерпевают жировое перерождение. Также малопригодны не спорулирующие (плеоморфные) культуры. Необходима предварительная обработка проб смесью стрептомицина, пенициллина, тетрациклина (100—200 ед. на 1 мл пробы) или 3—4-кратное введение животным указанных антибиотиков в течение первых 3 дней после заражения.

Для заражения отбирают здоровых животных, проверенных термометрией, взвешиванием, тщательным осмотром кожных покровов на возможные кожные поражения (очаги шелушения, облысения, изъязвления). Морских свинок, чувствительных к туберкулезу, подвергают внутрикожным туберкулиновым пробам. Больных и подозрительных животных для экспериментального заражения грибами не используют. После заражения животных изолируют. Ежедневно наблюдают за их поведением, температурой, массой; материал из очагов поражения погибших и убитых животных изучают микроскопически и высевают на разные среды. Выделенные из зараженного животного грибы сравнивают с таковыми, взятыми для заражения. Подстилку, навоз, трупы животных дезинфицируют или сжигают; инфицированный материал (инструменты, халаты, стекло и т. д.) стерилизуют.

XVII.8.1. МЕТОДЫ ЗАРАЖЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Методы заражения экспериментальных животных весьма разнообразны и осуществляются с учетом особенностей заболевания, вызываемого грибом в естественных условиях, и задач исследования. Для заражения используют взвесь осторожно растертых в физиологическом растворе культур или патологического материала с антибактериальными антибиотиками. Густота взвеси варьирует в зависимости от природы гриба, количества его клеточных элементов, характера и места заражения, массы животного. Гомогенизация взвеси и асептичность являются неизменными условиями экспериментального заражения.

Предварительно асептически растертые в ступке с физиологическим раствором кусочки культур или патологического материала фильтруют через несколько слоев стерильной марли и оставляют на 5—7 мин для осаждения видимых комочков. После этого взвесь втягивают тонкой иглой в шприц и вводят животным.

Эпидермальное заражение. Исследуемый материал втирают лабораторным животным в кожу спины между лопатками. Участок заражения предварительно депилируют, тщательно моют водой, протирают 70°-ным спиртом. Пораженные грибами волосы, чешуйки и культуры растирают между двумя листочками наждачной бумаги и втирают в кожу, избегая появления крови. Метод широко применяется для определения патогенности дерматофитов и других грибов, выделенных из очагов кожных поражений. Иногда для заражения используют растертый в агаре или жидком меде инфекционный материал, который втирают в скарифицированную препаровальной иглой кожу или в подкожные валики животных. Последнее практикуется для воспроизводства паронихий (воспалительных процессов около ногтевых валиков). В положительных случаях на 5—6-й день на месте заражения наблюдаются покраснение, линейные корочки, припухлость; к 11—13-му дню развиваются различной толщины беловато-желтоватые корочки, которые при сильном зуде сдираются, оставляя после себя кровоточащую, лишенную волос язву на месте втирания. Вокруг поражения нередко появляются мелкие очаги покраснения, гнойнички и корочки, которые со временем начинают шелушиться. В коротких беловатых волосках и кожных чешуйках выявляют грибы, по размерам, форме и распространению свойственные возбудителю соответствующего заболевания.

Внутрикожное заражение. Жидкий патологический материал или взвесь культур в физиологическом растворе по 0,05—0,1 мл вводят тонкой иглой в нескольких местах в чистую продезинфицированную спиртом кожу спины животных, в участках, недоступных для расчесов. Лучшим местом эпидермального и подкожного заражения является спина или бедро, но могут быть использованы и другие участки тела животного.

Экспериментальный онихомироз по В. В. Добромыслову, Ю. Е. Коневу, А. И. Дроздову [134]. Споровую взвесь культур трихофитов в физиологическом растворе густотой 500 тыс. клеток/мл вводят тонкой иглой в подкожный валик кроликам (шиншиллам) и морским свинкам. Забинтованные в марлю инфицированные конечности помещают («обувают») в металлические чулочки, которые прикрепляют к кольцу, охватывающему лапу выше сустава, чтобы животные не сбрасывали повязок. Через 10 дней после заражения очищенные от липкого пластыря и марли когти подвергают систематическому наблюдению и микологическому исследованию. В разгар поражения (15—25-й день) валики

гиперемированы, когтевая пластинка становится исчерченной, утолщенной и мутной. Грибы обнаруживают в пораженном когте микроскопически и культурально на протяжении 3 мес [134].

Субкутанное, подкожное заражение. Взвесь культур грибов или патологического материала в физиологическом растворе вводят кроликам (0,5—1 мл), морским свинкам (0,2—0,5 мл), белым мышам (0,1—0,2 мл) под кожу.

Интрагландулярное заражение. Взвесь гриба в объеме 0,05—0,1 мл вводят тонкой иглой шприца непосредственно в правый (или левый) паховый лимфатический узел морской свинки или кролика, другой узел остается контрольным. Припухание, казеозный распад и изъязвление на месте узла, иногда диссеминация процесса подтверждают предположение о патогенной активности изучаемого гриба.

Интратестикулярное заражение. Взвесь гриба вводят в толщу правого яичка, в левое для контроля вводят физиологический раствор такого же объема. Припухание и болезненность яичка, иногда образование гнойных свищей или генерализация микоза свидетельствуют о патогенности гриба.

Интраперитонеальное заражение. Взвесь гриба вводят внутрибрюшинно кроликам (1 мл), морским свинкам (0,5 мл), белым мышам и крысам (0,1—0,25 мл). Наличие микотических очагов при вскрытии, обнаружение грибов при микроскопии, получение ретрокультур являются иллюстративными показателями патогенности изучаемого гриба.

Внутривенное заражение. 0,5—1 мл тонкой гомогенной взвеси культур густотой 1—2 млн. клеток/мл вводят в краевую вену уха кролика или 0,05 мл — в вену хвоста белых крыс и мышей. Для более четкого выявления вен места введения предварительно распаривают в горячей воде. Доказательством патогенности гриба служат очаговые поражения разных тканей и органов с наличием тканевых форм гриба, получение соответствующих ретрокультур.

Интракардиальное заражение. Практикуется вместо внутривенного обычно на мелких лабораторных животных. Оно нередко сопровождается гибелью животных; используется для определения патогенности грибов. При внутривенном и интракардиальном введении грибы в течение первых 30—60 мин разносятся кровью по тканям и органам и при скарификации могут вызывать травматические кожные поражения грибковой природы.

Интраплевральное заражение. Используют для получения микотических плевритов и пневмомикозов. Взвесь гриба густотой 1—2 млн. клеток/мл вводят кроликам (1 мл), морским свинкам (0,5 мл), белым крысам и мышам (0,25—0,1 мл).

Интратрахеальное введение. Взвесь грибов обычной густоты вводят шприцем в трахею кроликам, свинкам, голубям и курам.

Респираторное заражение. Животные, помещенные в специальные камеры или сосуды типа эксикаторов, вдыхают в течение нескольких минут распыленную (аэрозольную) взвесь грибов разной густоты, равномерно поступающую в прибор. Этим методом достигается выявление патогенности гриба, экспериментальное моделирование легочных микозов и смешанных грибковых и вирусных инфекций, воспроизводство аэрогенной сенсibilизации.

Энтеральное заражение. Применяют для изучения микозов желудочно-кишечного тракта, для определения патогенности и токсигенности грибов, изолированных из желудочно-кишечного тракта, желчи больных людей и животных, а также для проверки токсичности пищевых продуктов, зараженных грибами. Молодые лабораторные животные (мор-

ские свинки, кролики, мыши, крысы, котята) считаются наиболее подходящими объектами для энтерального заражения, особенно при введении грибов через тонкий зонд натошак с молоком и жирной пищей, что способствует более быстрому развитию микотических процессов в различных органах.

Интрацеребральное (внутри мозговое) заражение. 0,01—0,02 мл взвеси грибов густотой 100—500 тыс. клеток/мл вводят непосредственно в мозговую ткань лабораторных животных через отверстие лобной кости (трепанация) или же в спинномозговой канал после взятия из него небольшого количества жидкости, соответствующего объему вводимого материала. Микотический процесс развивается довольно медленно, устанавливается на вскрытии погибших или убитых на 30—45-й день после заражения животных.

Висцеральный дерматомикоз. Для получения висцерального дерматомикоза по 0,2 мл гомогенной взвеси 15—20-суточных культур патогенных трихофитонов в физиологическом растворе вводят внутривенно мышам массой 18—20 г (3—4 млн. клеток/мл) и крысам (15—20 млн. клеток/мл). Узелковые поражения с элементами гриба в гнойном содержимом обнаруживается в течение 3-х мес в печени, почках и селезенке и до 30 дней в легких и мышце сердца [133]. Последовательное 4—5-кратное экспериментальное заражение ретрокультурами, выделяемыми из очагов поражения зараженных ранее животных, способствует усилению патогенности и повышению вирулентности изучаемых грибов. Повторные (пассажные) перевивки грибов путем последовательного интратестикулярного заражения считаются наиболее эффективными для усиления их патогенной активности.

Кролики наиболее пригодны для изучения динамики развития микотической инфекции и иммунитета, а также для получения специфических иммунных сывороток. Морских свинок обычно используют для изучения микогенной сенсibilизации; белых мышей — для определения максимальной смертельной дозы (ДЛМ) возбудителей глубоких и респираторных микозов, изоляции их из почвы и воздуха, решения вопросов эпидемиологии.

XVII.8.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННОСТИ ГРИБОВ

Для определения степени патогенности грибных культур используют их гомогенные взвеси различной густоты, полученные путем последовательного (1 : 10) разведения в физиологическом растворе. Количество клеток в первоначальной исходной взвеси подсчитывают в камере Горяева с одновременным высевом на среду Сабуро в чашки Петри для количественного учета жизнеспособных клеток. ДЛМ устанавливают с учетом количества клеток введенного гриба и сроков гибели животных применительно к каждому методу введения. Патогенность возбудителей респираторных микозов оценивают по результатам интраназального заражения белых мышей в обе ноздри (по 0,05 мл) гомогенной взвесью культуры разной густоты под наркозом.

На экспериментальных моделях грибковых заболеваний с успехом изучают своеобразие тканевых реакций, особенности течения и своеобразие иммунологических процессов, эффективность терапии и специфической профилактики. Предварительное ослабление организма животных авитаминозом и голоданием, перегреванием или охлаждением, диабетическим процессом, различными иммунодепрессантами, избытком

антибиотиков способствует развитию микозов и в опытах по моделированию висцеральных заболеваний. Учет дозы вводимого гриба, глубины и тяжести экспериментального процесса позволяет судить о степени его патогенности.

XVII.9. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Серологические реакции используют для определения иммунной перестройки организма путем выявления в сыворотках соответствующих антител, обнаружения в крови специфических антигенов из возбудителей заболевания и для серологической и типоспецифической характеристики возбудителя. Специфичность антигенов и антител, т. е. строгое соответствие их при взаимодействии, лежит в основе широкого использования серологических реакций для установления истинной природы соответствующих заболеваний (возбудителя), выявления иммунологических реакций и степени их напряженности (титров антител), эпидемиологического анализа источников и путей инфекции, определения природы аллергических заболеваний, включая и профессиональные, для рациональной иммунотерапии и профилактики грибковых заболеваний [149, 199, 203, 204].

XVII.9.1. ВЗЯТИЕ КРОВИ, ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРЕСЫЛКА СЫВОРОТОК

Непременными компонентами всех серологических реакций являются испытуемая сыворотка и известный антиген или, наоборот, испытуемый микроб и известная, соответствующая ему иммунная сыворотка. Кровь для серологических реакций берут натошак или через 5—6 ч после приема пищи шприцем (5—7 мл). Затем кровь переливают в сухие стерильные пробирки и помещают их в термостат на 1 ч при 37° С для образования сгустка. После отделения сгустка прокаленной бактериологической петлей или лопаткой (для лучшего формирования сгустка) пробирки выдерживают в течение последующих суток при температуре 4—5° С. Затем сыворотку осторожно отсасывают пипеткой не допуская попадания эритроцитов и переносят в сухую стерильную пробирку. Сыворотку «инактивируют» прогреванием на водяной бане в течение 30 мин при 56° С для разрушения комплемента (активная, защитная фракция сыворотки крови) и понижения степени дисперсности белков.

При необходимости пересылки сыворотки в другие лаборатории ее консервируют мертиолатом в соотношении 1 : 10 000 и асептично переносят в стерильные ампулы, которые запаивают на пламени. Диагностические сыворотки можно пересылать в виде двух толстых капель по 0,5 мл каждая, нанесенных на полоску обычной или фильтровальной бумаги, высушенной при комнатной температуре и снабженной надписью. Высушенные сыворотки пригодны для работы в течение 10 дней. Их можно пересылать почтой вместе с сопроводительной бумагой, в которой указаны принадлежность сыворотки и реакции, которые необходимо с ней проводить.

В лаборатории обе высушенные капли сывороток вырезают ножницами и погружают в пробирки, содержащие 1 мл физиологического раствора, на 1 ч при комнатной температуре, после чего бумагу извлекают, а сыворотку используют как нативную для постановки серологических реакций.

XVII.9.2. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

Для постановки реакции агглютинации необходимо иметь разведенную исследуемую сыворотку, физиологический раствор и взвесь убитых грибов в качестве специфического антигена. Исследуемую сыворотку разводят в ряде чистых, лучше стерильных, пробирок. Во все пробирки, кроме первой и последней, вносят по 1 мл физиологического раствора. В первую пробирку вносят 2,7 мл физиологического раствора и 0,3 мл исследуемой неразведенной сыворотки. После перемешивания повторным втягиванием в пипетку из первой пробирки отбирают 2 мл и вносят в последнюю и во вторую пробирки, из второй в третью и так до предпоследней, в которой остается только физиологический раствор.

В качестве антигена используют взвесь фрагментов мицелия и спор грибов в физиологическом растворе, профильтрованную через трехслойный стерильный марлевый фильтр. Густота взвеси 100 млн. клеток/мл, убитых прогреванием в водяной бане при 70° С в течение 2 ч или карболизированных 25%-ным раствором фенола.

Антиген вносят пастеровской пипеткой в соответствующие пробирки с разведенной сывороткой по 3—4 капли (кроме последней, контрольной). Контрольными служат первая пробирка, не содержащая сыворотки, и последняя — с сывороткой, не содержащей антиген.

Набор пробирок в штативе тщательно встряхивают, помещают на 2 ч в термостат, после чего выдерживают в течение 18—20 ч при комнатной температуре или в холодильнике при 4—5° С. Результаты реакции учитывают через сутки, сравнивая их с контрольными пробирками. В первой контрольной пробирке, где отсутствует сыворотка, жидкость должна быть гомогенной, мутной, не содержать ни хлопьев, ни зерен. Во второй пробирке (без антигена) жидкость должна быть прозрачной. При наличии хлопьев в мутной жидкости реакция оценивается как положительная (2+); при сохранении исходной гомогенной мути реакция считается отрицательной. Титр реакции определяется разведением сыворотки в последней пробирке, где реакция имеет оценку не менее чем 2+.

Реакцию агглютинации оценивают визуально, отмечая плюсами (от + до +++++), или методом Сергиева. Для этого результат реакции, выраженный плюсами, умножают на частное от деления степени разведения в данной пробирке на степень разведения в первой. Например, в пятой пробирке сыворотка разведена в 160 раз и результат реакции оценен +++++; разведение в первой пробирке 1 : 10, тогда количественная оценка реакции агглютинации по Сергиеву будет равна $4 \cdot 160/10 = 64$. Оценочный индекс в этом случае выводят из суммы оценок реакций в каждой пробирке.

XVII.9.3. РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Для постановки реакции необходимо иметь эритроциты барана, иммунную и нормальную сыворотки кроликов и специфический антиген из грибов. Двухдневные эритроциты отмывают 2—3 раза вероналовым буфером, добавляют 0,1 мл осевших при отстаивании клеток к 4 мл полисахаридного антигена в разведении 1 : 100 — 1 : 200, доведенного 0,1 н. раствором NaOH до pH 7,3. Смесь выдерживают при 37° С в течение 2 ч (встряхивают каждые 15—20 мин), затем центрифугируют при 1000—1500 об/мин; промывают свежеприготовленным вероналовым буфером и вновь трижды центрифугируют, после чего клетки заливают буфером до получения 0,5%-ной суспензии.

Для удаления неспецифических к эритроцитам антител из сывороток к 1 мл последних добавляют по 0,1 мл 0,5% -ной взвеси нормальных эритроцитов. Смесь инкубируют в течение 10 мин при 37° С с последующим выдерживанием при 4—6° в течение 4—5 ч. Клетки отделяют центрифугированием при 1000—1500 об/мин, а сыворотки разводят вероналовым буфером (1 : 2 — 1 : 8192; двукратные разведения) и по 0,4 мл разливают в вассермановские пробирки. Туда же добавляют по 0,4 мл сенсibilизированных эритроцитов. Пробирки энергично встряхивают и оставляют при 37° С в течение 1,5—2 ч. Контролями служат нормальные эритроциты и вероналовый буфер. При отрицательной реакции эритроциты осаждаются на дно и компактно заполняют конусовидную часть пробирки. При положительной реакции все дно пробирки покрыто рыхлым слоем эритроцитов; после легкого встряхивания проявляется агглютинация в виде крупных хлопьев, четко видных с помощью зеркала.

XVII.9.4. РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ

Двухкомпонентная реакция, для постановки которой нужны исследуемая сыворотка и соответствующий антиген (полисахарид или ультразвуковой дезинтеграт из грибов). Реакцию проводят в пробирках диаметром 0,75 см, в которые вносят по 0,5 мл испытуемой сыворотки, затем осторожно по стенке из пастеровской пипетки наслаивают раствор антигена (перемешивания жидкости не допускается).

В положительных реакциях в зоне соприкосновения сыворотки и антигена иногда сразу же образуется беловатое мутное кольцо из выпадающего преципитата. При отсутствии кольца пробирки помещают в термостат при 37° С на 2 ч. Реакция оценивается по степени разведения антигена (обычно десятикратном, начиная с 1 : 100). Контролем служат аналогичные реакции с тем же антигеном, в которых испытуемая сыворотка заменяется заведомо отрицательной и физиологическим раствором. Кольцо при этом не образуется, жидкости остаются прозрачными.

XVII.9.5. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

В последние годы широкое распространение получила реакция преципитации в агаровом геле по Оухтерлони, для постановки которой требуется специально обработанный агар, исследуемая сыворотка и специфический антиген, чаще полисахаридной природы. Агар-агар тщательно промывают в течение 8—10 ч проточной водопроводной водой, затем 4 сут дистиллированной водой, сменяемой 2—3 раза в сутки. Затем готовят 2%-ный агар на дистиллированной воде с добавлением бромфенолового синего (0,1 мг%) и 0,85% поваренной соли. Раствор стерилизуют в автоклаве при 120° С в течение 30 мин, разливают в чашки диаметром 6 см или чашки Петри диаметром 10 см. После застывания агара в нем вырезают до дна отверстия с помощью пробочного сверла диаметром 2—3 мм. Одно отверстие делают в центре и 4—6 — по периферии на расстоянии 0,8 см от центра. На дно углублений вносят по 1 капле расплавленного агара того же состава. После застывания среды чашки подсушивают в термостате и в центральное углубление вносят 0,1 мл испытуемой цельной или разведенной (1 : 2) сыворотки, а в периферические — по 0,1 мл раствора антигена в разведении 1 : 100 — 1 : 500.

В течение 15 дней чашки выдерживают в строго горизонтальном положении при 4—6° С.

Количество, взаиморасположение и четкость преципитационных линий могут быть различными; быстрота их выявления колеблется в широких пределах (от нескольких часов до 5—7 дней). С гомологичными антигенами линии преципитации выявляются быстрее, чем с гетерологичными, где они менее выражены и расплывчаты. С антигенами из свежевыделенных штаммов преципитационные линии получаются более четкими, чем с таковыми из музейных культур.

XVII.9.6. РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

Антигенами служат растворимые полисахариды, белковые или комплексные вытяжки из грибов или культуральной жидкости соответствующих грибов. Наиболее пригодными считаются антигены, полученные воздействием ультразвука, или β-нафтольные препараты, слабее действуют фенольные и спиртоводные вытяжки.

Для взаимодействия в реакции специфических компонентов (антигена и антитела) необходим комплемент — термолабильное белковое вещество, содержащееся в свежей сыворотке крови большинства млекопитающих. Содержание комплемента в сыворотках животных и человека не постоянно, избыток и недостаток его отражаются на точности результатов РСК. В связи с этим испытуемые сыворотки предварительно прогревают на водяной бане при 58° С в течение 30 мин (для инактивации комплемента). Поэтому в реакцию берется строго определенное количество комплемента, полученного из крови морских свинок; его рабочая доза определяется титрованием перед каждой постановкой РСК.

В положительных случаях соответствующие антитело и антиген взаимодействуют с комплементом, но выпадающий при этом осадок остается невидимым для глаза. Поэтому для выявления этого взаимодействия вводят вторую индикаторную систему, которая не участвует в первой реакции, но для взаимодействия компонентов которой также необходим комплемент. Эта индикаторная система состоит из антигена (эритроциты барана) и антитела (специально полученной «гемолитической» сыворотки кролика, растворяющей эритроциты барана в присутствии комплемента).

В положительных случаях комплемент связывается первой системой и гемолиз не наступает, реакция оценивается в ++++. При отрицательной РСК антиген и антитело первой системы не взаимодействуют, комплемент остается не связанным и участвует в индикаторной реакции между эритроцитами барана и «гемолитической» сывороткой кролика. При этом в опытной пробирке наблюдается гемолиз, реакция оценивается как отрицательная (—).

Постановка РСК сложна, требует строгой последовательности, воспроизводимых условий реакции, использования определенных концентраций ингредиентов, рабочие дозы которых (антигенов, сывороток, комплемента) предварительно устанавливают перед каждой реакцией с учетом оптимальных условий взаимодействия. Постановка РСК с грибковыми антигенами почти не отличается от таковых при бактериальных и вирусных инфекциях, которые проводятся соответственно требованиям специальных инструктивных методических указаний МЗ СССР.

С помощью РСК выявляют специфические антитела, характеризуют иммунологические сдвиги в процессе болезни и выздоровления, идентифицируют грибковые антигены, определяют соответствующих им

возбудителей грибковых заболеваний. При некоторых глубоких микозах, в сочетании с результатами аллергических проб, РСК используют для оценки тяжести микоза и прогноза исхода болезни.

XVII.9.7. РЕАКЦИЯ ИММУНОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Для быстрой идентификации грибов в исследуемом материале используют прямой и непрямой методы флуоресцирующих антител. Для этого мазки мокроты, гноя, осадки мочи и желчи, спинномозговой жидкости, отпечатки органов и тканей, вытяжки из почвы на обезжиренных стеклах подсушивают на воздухе и фиксируют смесью Никифорова или раствором Дюбуа (20 мл насыщенного раствора сулемы, 5 мл уксусной эссенции, 1 мл 38%-ного раствора формалина). Затем препараты помещают в чашки Петри или кюветы в условиях влажной камеры.

Если препараты окрашивают прямым методом, то на поверхность мазка наносят каплю конъюгата и помещают на 15—20 мин в термостат при 37° С. Меченные флюорохромом антитела (конъюгат) взаимодействуют с антигеном — клетками гриба с образованием комплекса антиген — антитело, флуоресцирующего в УФ-свете. Избыток конъюгата необходимо смывать в течение 15 мин забуференным физиологическим раствором, который состоит из 1 части 0,15 М фосфатного буфера (рН 7,2—7,4) и 9 частей 0,85%-ного раствора NaCl, а затем сполоснуть водой. После просушивания на воздухе или в термостате препараты исследуют под микроскопом МЛ или МБИ-1, снабженным люминесцентным устройством ОИ-17 со светофильтрами СФ-1 и СЗС-7 или СЗС-14; окуляр — ЖС-3.

При окраске препарата непрямым методом на поверхность мазка наносят каплю иммунной кроличьей сыворотки или глобулина. При этом антитела сыворотки взаимодействуют с антигеном, образуется несветящийся комплекс антиген — антитело. После 30 мин инкубации при 37° С во влажной камере избыток сыворотки смывают забуференным физиологическим раствором, просушивают на воздухе и наносят каплю меченой флюорохромом антикроличьей сыворотки на 15—25 мин. Сыворотка взаимодействует с кроличьим иммунным глобулином, адсорбированным на клетках грибов, образуя светящийся комплекс. Приемы микроскопии такие же, как и в прямом методе.

XVII.9.8. ПОЛУЧЕНИЕ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК

Серологические реакции используются для идентификации грибных культур, выделенных от больных и из внешней среды. Для этого необходимы специфические сыворотки высокого титра, получаемые от кроликов, иммунизированных соответствующими культурами патогенных и условно-патогенных грибов, а также продуценты различных биопрепаратов. Антигеном для иммунизации служит гомогенная взвесь из агаровой культуры гриба в физиологическом растворе. Более быстрое накопление антител наблюдается при более частом введении антигена (через 3—4 дня). Наиболее высокие титры антител достигаются в результате 2—3 прививочных циклов с 10—15-дневными интервалами между ними. Через 10 дней после окончания вакцинации из краевой вены уха кролика берут кровь, специфическую активность и титры которой устанавливают в серологических реакциях.

Для выявления грибкового антигена в крови больных и переболевших используют РСК на холоду, при температуре 3—5° С; специфическая иммунная сыворотка для этого берется в разведении 1 : 5 — 1 : 10, а исследуемая от больного — в разведении 1 : 3.

XVII.10. АНТИГЕНЫ

Антигены являются вторым необходимым компонентом серологических реакций и аллергических проб. Они бывают корпускулярные (взвесь убитых клеток грибов) и растворимые (вытяжки полисахаридной, белковой или комплексной природы). Антигены получают из зрелых, но не старых культур дрожжеподобных (5—7-дневных) и мицелиальных (15—20-дневных) грибов, выращенных поверхностным способом на подходящих плотных или жидких питательных средах в

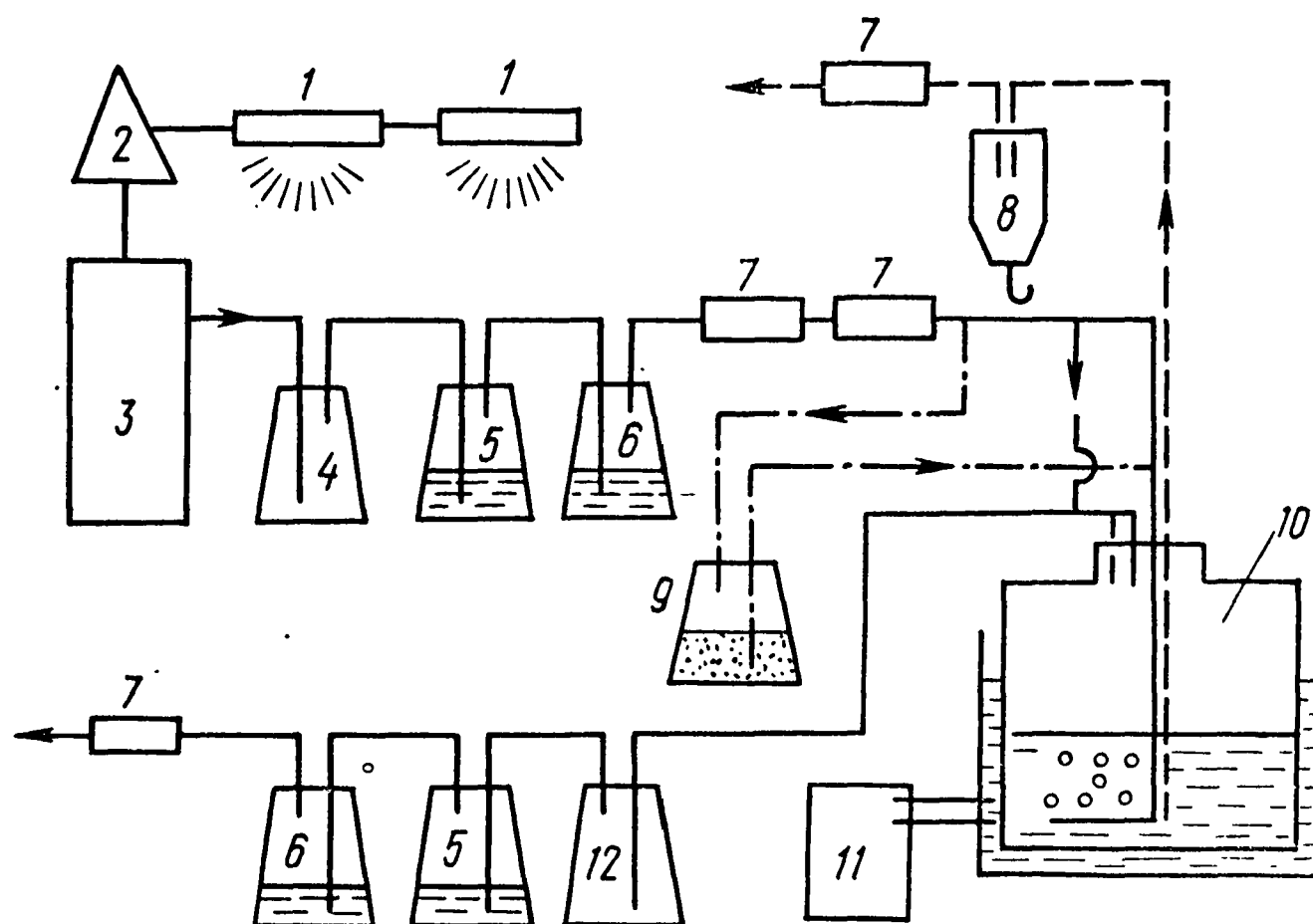


Рис. 127. Схема лабораторной установки для культивирования грибов (— ферментирование; — · — засев; — — — взятие пробы):

1 — бактерицидные лампы; 2 — позиционное реле; 3 — компрессор для нагнетания воздуха; 4 — ловушка с ватой для притекаемого воздуха; 5, 6 — ловушки, заполненные растворами фенола и щелочи соответственно; 7 — фильтры; 8 — сосуд для отбираемых проб; 9 — ловушка; 10 — ферментер, помещенный на водяную баню; 11 — ультратермостат; 12 — ловушка для пены.

стеклянных матрасах емкостью 0,5 1,5; 2 л при оптимальной для развития температуре (25 или 37° С) или погруженным способом.

При погруженном выращивании развитие грибов происходит в 2—3 раза быстрее, урожай (грибница) в 2—3 раза выше; при этом антигенные свойства и специфичность грибов в соответствующих реакциях сохраняются.

Показателями оптимальной пригодности грибов для получения соответствующих антигенов считаются интенсивность их споруляции, конидиальное размножение характерной формы и размеров, наличие почкующихся форм дрожжеподобных грибов при незначительном содержании старых, богатых липидами клеток [149, 199, 200, 202].

Для накопления биомассы дрожжеподобных и мицелиальных грибов погруженным методом выращивания пригодной оказалась лабораторная установка М. П. Нефедова, А. П. Кашкина (рис. 127), состоящая из сосуда для культивирования — ферментера (10) — стеклянной бутылки емкостью 20 л, заполненной на $\frac{2}{3}$ питательной средой. Бутылка герметически закрыта резиновой пробкой, через которую пропущены барботер (Г-образная трубка из нержавеющей стали с рядом отверстий 1,0—1,5 мм) и трубка для отвода избыточного давления. Воздух нагнетается компрессором (3) и поступает последовательно в ловушку с ватой (4) и ловушки (5 и 6), заполненные 5%-ным раствором фенола и 30%-ным раствором щелочи соответственно, и далее через фильтры (7) и ферментер (10). Для обеспечения стерильных условий в помещении с установкой для культивирования имеются бактерицидные лампы БУВ-15 (1), режим работы которых задают с помощью позиционного реле (2). Воздух, выходящий из ферментера, последовательно проходит через ловушку для пены (12) и ловушки (5 и 6), заполненные соответственно растворами фенола и щелочи, и далее через фильтр (7) поступает в атмосферу. Необходимый температурный режим в ферментере поддерживают с помощью ультратермостата (11), из которого подогретая вода поступает в емкость, где находится ферментер.

Все коммуникации изготовлены из силиконовых трубок; в местах разветвления использованы стеклянные трубки различного диаметра. Систему стерилизуют в два приема: сосуд для ферментации с питательной средой и установленным на место барботером и коммуникации [319].

Для получения полноценных антигенов необходимо применять стандартные и оптимальные питательные среды и условия выращивания. Антигены получают из грибницы, отделенной от жидкой среды фильтрованием или соскобом стерильной лопаткой, реже — смывом с поверхностных культур, выращенных на плотных агаровых средах. Собранную в фарфоровую ступку грибную массу растирают пестиком в физиологическом растворе до получения гомогенной взвеси; разливают в колбочки, автоклавируют при 100—110° С в течение 10 мин или подогревают в течение одного часа при 70—80° на водяной бане.

ХVII.10.1. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГРИБНЫХ АНТИГЕНОВ И АЛЛЕРГЕНОВ

ХVII.10.1.1. МЕТОД ПЛЯТО — НЕЙССЕРА

Самым старым методом получения аллергенов из патогенных мицелиальных грибов является метод Плято — Нейссера, видоизмененный Блохом. Грибы выращивают на жидкой среде Сабуро, содержащей 1% пептона и 4% мальтозы. Через 3 мес роста при 26° С мицелий отделяют, помещают в стерильную ступку и растирают замороженным снегом угольной кислоты со стерильным песком (кизельгуром). После измельчения мицелия в ступку добавляют культуральную жидкость до получения кашицеобразной массы и 0,25—0,5%-ный раствор фенола. Грибную массу переносят в колбу, встряхивают в течение часа, затем колбу ставят в термостат при 37° С на 24 ч. Жидкость фильтруют через асбестовый фильтр или свечу Шамберлана. Фильтрат разливают по ампулам и используют в качестве аллергена.

XVII.10.1.2. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ ПО БУАВЕНУ И МЕСРОБЕАНУ

Клетки грибов, выращенных на плотных или жидких питательных средах, отмывают от среды физиологическим раствором при повторном (2—3-кратном) взбалтывании и отстаивании или центрифугировании, подсушивают в термостате до получения воздушно-сухой массы. Затем их заливают 0,5%-ным раствором ТХУ в соотношении 10—20 частей кислоты на 1 часть клеток. Хорошо размешанные клетки выдерживают в течение 12 ч при 4—5° С, центрифугируют, жидкость сливают, подщелачивают 0,25%-ным раствором NaOH до pH 7,2. После этого к жидкости прибавляют 3—4-кратный объем этилового или метилового спирта до осаждения полисахарида, дающего положительную реакцию Молиша.

XVII.10.1.3. ФЕНОЛЬНЫЙ МЕТОД КОНИКОВА

Микробные клетки, отмытые от питательной среды физиологическим раствором, взбалтывают с небольшим количеством воды и осаждают тройным объемом ацетона. Полученный осадок клеток промывают дважды ацетоном, а затем один раз эфиром. Большая часть эфира удаляется из осадка свободным испарением, а оставшаяся — в вакуум-эксикаторе.

Навеску высушенных таким образом клеток помещают в фарфоровую ступку, нагретую на водяной бане до 50—70° С. Пипеткой, также нагретой на пламени спиртовки, набирают нужное количество предварительно расплавленного фенола (из расчета 1 мл фенола на 1 г клеток), прибавляют к навеске клеток гриба и растирают пестиком для получения однородной массы. Через 30—45 мин в ступку постепенно при растирании наливают подогретую до 50° С дистиллированную воду в объеме, необходимом для получения 5%-ного раствора фенола. Молочно-белую фенольную суспензию подвергают длительному центрифугированию при 3000 об/мин и опалесцирующую надосадочную жидкость декантируют или отсасывают пипеткой. Для удаления фенола экстракт диализируют в проточной воде 48 ч (до исчезновения запаха фенола). При наличии белков их удаляют, подкисляют диализат 0,1 н. раствором соляной кислоты до pH 4—5. При этом белки выпадают в осадок, который центрифугируют, а к надосадочной жидкости прибавляют 2—3 объема этилового спирта или ацетона (лучше обезвоженных). Осадок полисахарида центрифугируют, промывают спиртом и эфиром, высушивают и сохраняют долгое время (без потери активности).

XVII.10.1.4. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ ПРИ ОБРАБОТКЕ КЛЕТОК МОЧЕВИНОЙ [199]

Воздушно-сухую грибную массу в количестве 12,5 г смешивают с 750 мл 15%-ного раствора химически чистой мочевины и нагревают в течение 9 ч при 38° С при периодическом встряхивании. Смесь заливают толуолом, оставляют на ночь при 4—5° С и центрифугируют. Жидкость диализируют под слоем толуола для удаления мочевины, фильтруют через свечу, концентрируют в вакуум-аппарате до небольшого объема. Полисахарид осаждают этиловым спиртом, который добавляется в двойном или тройном количестве по отношению к сгущенному экстракту. Осадок антигена центрифугируют, промывают спиртом и эфиром, высушивают в вакуум-эксикаторе или при 37° С в термостате. В сухом виде он сохраняется несколько лет без потери антигенной активности.

XVII.10.1.5. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ ПРИ ОБРАБОТКЕ КЛЕТОК β-НАФТОЛОМ [149]

Культуры гриба выращивают на плотной или жидкой среде, убивают кипячением или автоклавированием, отмывают физиологическим раствором, центрифугируют. Осадок подсушивают в термостате 2—3 ч или высушивают до постоянной массы при 105° С в сушильном шкафу. После этого клетки тщательно растирают в теплой (50° С) ступке в течение 30—40 мин со спирто-водным раствором β-нафтола, взятого из расчета 0,5 части на 1 часть клеток (до полного растворения β-нафтола).

При получении антигена из сухих клеток последние следует размолоть на шаровой мельнице, затем перенести в ступку с пестиком, смешать с β-нафтолом, после чего прилить дистиллированной воды (1 : 1 по отношению к β-нафтолу), вновь тщательно размешать и добавлять этиловый спирт до растворения β-нафтола. Затем прилить теплую (50° С) дистиллированную воду до получения 3%-ного раствора β-нафтола и оставить смесь на сутки в термостате при 37° С или при комнатной температуре. После этого смесь следует отцентрифугировать. Надосадочную жидкость сливают и добавляют к ней двукратный объем 96%-ного этилового спирта при последующем подкислении (по каплям) 0,1 н. соляной кислотой до рН около 4—5. Выпавшие в осадок хлопья полисахарида собирают центрифугированием, промывают спиртом и эфиром, высушивают либо в вакуум-эксикаторе над серной кислотой, либо в термостате при 37° С. Порошок растирают в стерильной ступке и сохраняют в рефрижераторе при 4—5° С в течение нескольких лет.

XVII.10.1.6. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ АНТИГЕНОВ

Для получения ультразвуковых (УЗ) антигенов используют взвесь из 30 мг грибницы, собранной с плотных или жидких сред, 1 мл стерильной дистиллированной воды. Взвесь обрабатывают ультразвуком при постоянном охлаждении проточной водой в течение 2—3 ч. Ультразвуковую обработку производят в специальных аппаратах при частоте волны 800 кГц и мощности 4,5—5 Вт/см². Затем взвесь центрифугируют 30 мин при 6500 об/мин и надосадочную опалесцирующую жидкость лиофилизируют. Полученный слегка желтоватый, рыхлый порошок легко растворяется в воде и солевых растворах. Выход антигена составляет в среднем 15% сухой массы озвученных клеток. Пригодными для работы считаются антигены, дающие положительные реакции до предельного титра соответствующих сывороток; отрицательные или слабо положительные реакции в низких титрах с гетерологическими сыворотками (против родственных грибов) и четко отрицательные реакции с нормальными сыворотками и с физиологическим раствором.

XVII.10.2. МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ТКАНЕВЫХ ФОРМ НЕКОТОРЫХ ДИМОРФНЫХ ГРИБОВ

Метод основан на вшивании в организм мышей, белых крыс и кроликов диффузионных камер, пропускающих жидкости организма, но задерживающих клетки. В камерах создается оптимальная среда для роста и накопления гриба в тканевой форме без примеси клеток хозяина. Камеры пригодны как для быстро, так и для медленно растущих дрожжевых и мицелиальных грибов, и позволяют наблюдать за их развитием в течение недель и месяцев.

Диффузионные камеры представляют собой пластмассовые кольца, заклеенные с двух сторон миллипоровым фильтром (№ 1, 2, 3 — размер пор не более 0,7 мкм). Разработанный Р. А. Аравийским метод культивирования патогенных грибов в диффузионных камерах оказался полезным для выяснения деталей морфогенеза тканевых форм различных диморфных грибов, характеристики особенностей их метаболизма, получения стадиоспецифичных антигенных препаратов, а также для изучения взаимодействия лекарственных препаратов на тканевые формы, выявления характерных изменений тканевых форм патогенных грибов под влиянием лекарственных препаратов [7].

XVII.11. ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ

Для выявления микогенной сенсibilизации в качестве специфических аллергенов применяют вакцины из убитых грибов, фильтраты, белковые или полисахаридные извлечения жидких культур. Их широко используют в кожных аллергических реакциях, выявляющих гиперчувствительность немедленного (ГНТ) и замедленного (ГЗТ) типов, и в пробирочных реакциях: лейкоцитолизе, бластотрансформации и др.

Для иммунотерапии микозов и десенсибилизации микогенной аллергии применяют поливалентные вакцины (из нескольких штаммов грибов) и автовакцины из культур, выделенных от самого больного. Густота вакцинных взвесей в физиологическом растворе колеблется от 100 до 200 тыс. грибных клеток, убитых прогреванием при 80° С в течение 2 ч на водяной бане и консервированных добавлением фенола (до 0,25%). Необходимым требованием для любых аллергенов является их стерильность, которая достигается повторным прогреванием в водяной бане в течение 1 ч при 70—80° С. Бесклеточные антигены и аллергены стерилизуют пропусканием через фильтры Зейтца, воздействием УФ-лучей в кварцевой посуде. Полисахаридные препараты стерилизуют прогреванием при 110° С в течение 20 мин в автоклаве. В качестве консервантов для всех аллергенов используют 0,25%-ный раствор фенола или мертиолат (1 : 10 000). Стерильность аллергенов проверяют посевами на жидкие питательные среды в аэробных и анаэробных условиях; срок наблюдения за ростом грибов 15 дней. Безвредность препаратов проверяют на белых мышах при внутрибрюшинном введении 0,5 мл аллергена; контролем служит физиологический раствор, содержащий тот же антисептик, который был использован для консервирования препарата. Срок наблюдения за животными 10 дней. В поведении опытных мышей не должно быть отклонения от контрольных, получавших физиологический раствор с антисептиком. Срок наблюдения за животными 7—10 дней. Нестерильные и вредные для животных препараты не допускают к использованию в лечебных целях.

Для определения минимальной дозы все антигены стандартизируют биологическими методами на экспериментальных животных, больных и здоровых людях. Для выявления специфической аллергии используются следующие методы.

1. Эпикутанная проба — нанесение на скарифицированную кожу аллергена на стерильной марле или впитывающей бумаге (1 × 1 см), покрытой целлофаном, вощанкой, тонкой компрессной клеенкой.

2. Эпидермальная проба — нанесение аллергена по одной капле на линейные скарификации, отстоящие одна от другой на 2,5—4 см.

3. Внутрикожная проба — введение 0,1 мл аллергена в кожу предплечья, наружную поверхность плеча или спины, предварительно протертую этиловым спиртом. В качестве контроля используют физиологический раствор, содержащий 0,025% фенола. Последняя реакция широко применяется.

Результаты аллергических проб учитывают через 2, 24 и 48 ч; покраснение с образованием папулы на месте нанесения аллергена ука-

Т а б л и ц а 36. Схема оценки кожных проб

Обозначение реакции	Реакция немедленного типа (учет через 20 мин и 2 ч)	Реакция замедленного типа (учет через 24 и 48 ч)
Отрицательная (—)	Как в контроле, в месте введения Аг образуется лимонная корочка, гиперемия слабо выражена	Как в контроле, инфильтрат и гиперемия отсутствуют либо гиперемия слабо выражена
Сомнительная (±)	Волдырь размером 5—6 мм со слабой гиперемией, сохраняющейся не менее 2 ч	Инфильтрат размером до 5 мм и слабой гиперемией
Слабо положительная (+)	Волдырь размером 7—10 мм с гиперемией, сохраняющейся не менее 2 ч	Инфильтрат размером 6—10 мм, гиперемия средней интенсивности
Положительная (++)	Волдырь размером 11—19 мм с выраженной гиперемией, сохраняющейся не менее 2 ч	Инфильтрат размером 11—19 мм с выраженной гиперемией
Положительная (+++)	Волдырь размером 20—29 мм с ярко выраженной гиперемией, сохраняющейся не менее 2 ч	Инфильтрат размером 20—29 мм с резко выраженной гиперемией
Резко положительная (++++)	Волдырь размером 30 мм и более с ярко выраженной гиперемией, сохраняющейся не менее 2 ч	Инфильтрат размером 30 мм и более с ярко выраженной гиперемией

зывает на положительную реакцию. Оценка немедленных и замедленных аллергических кожных проб приводят с учетом интенсивности реакции по схеме, представленной в табл. 36. Специфическую активность аллергена изучают в прямых и перекрестных реакциях на здоровых и sensibilized вакцинами из разных грибов кроликах и морских свинках.

Для сенсibilизации используют вакцины в смеси с неполным адьювантом Фрейда из расчета: 5 мг высушенных предварительно убитых нагреванием при 60° С клеток гриба на 100 г массы животного в 0,25 мл адьюванта и 0,25 мл физиологического раствора для свинки или по 0,5 мл адьюванта и физиологического раствора для кролика. Приготовленную смесь вводят однократно подкожно в область лопатки. Внутрикожные аллергические пробы ставят через 3 нед после сенсibilизации введением 0,1 мл соответствующего аллергена. Результаты учиты-

вают через 20 мин, 2, 24 и 48 ч по общепринятой схеме. Для оценки сенсibilизирующих свойств самого аллергена некоторые серии его вводят кроликам 3-кратно внутрикожно по 0,1 мл на 1-, 12-, 22-е сут и морским свинкам на 1-, 27-, 62-е сут.

Испытуемый аллерген у здоровых животных не дает положительных реакций, тогда как у иммунизированных повторным введением соответствующего аллергена получают отчетливые положительные реакции.

У животных, сенсibilизированных гетерологичными антигенами, реакция бывает отрицательной, слабо положительной или сомнительной. Положительные реакции иногда получают на антигены из грибов того же рода.

ХVIII. ОСНОВНЫЕ МИКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ФИТОПАТОЛОГИИ

ХVIII.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ЗАБОЛЕВАНИЯХ РАСТЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ГРИБАМИ [108, 112, 123, 131, 141, 210, 293, 340, 346, 351, 369, 370, 412, 426, 470, 594]

Среди возбудителей инфекционных болезней растений грибы — самая многочисленная группа, насчитывающая более 10 тыс. видов различных по систематическому положению, степени паразитизма, специализации и т. п. Болезни растений, вызываемые грибами, делят на несколько групп на основании сходства внешних признаков.

Увядание (вилт). Широко распространенное заболевание, связанное с поражением корневой и проводящей систем. Паразит локализуется в трахеях, поэтому увядание называют трахеомикозным. Внешние признаки заболевания: некрозы ткани листьев, пониклость листьев, ветвей и других органов. Это связано с потерей тургора клеток вследствие проникновения грибных организмов в сосудистую систему, действия выделяемых ими токсинов и закупорки проводящих сосудов. На поперечном срезе растений, пораженных вилтом, отмечается потемнение сосудистого кольца. По этому признаку вилт отличают от увядания в результате действия физиологических факторов внешней среды и механических повреждений.

Основные возбудители увядания — виды родов *Fusarium* и *Verticillium*.

Гнили. Характеризуются размягчением и разрушением тканей растений. Под влиянием ферментов (пектиназ, гемицеллюлаз), выделяемых грибами, растворяется межклеточное вещество (пектин) растительных клеток, они распадаются (мацерируются). Затем разрушению подвергаются стенки клеточных оболочек. Пораженная ткань разрыхляется, размягчается и превращается в кашицеобразную или полужидкую бесформенную массу. Гнили могут быть мокрыми и сухими. Мокрые гнили чаще всего образуются в органах и тканях, богатых водой (клубнях, луковицах); сухие — в тканях, относительно бедных водой (фузариоз клубней картофеля, трутовые грибы и др.). Твердые гнили возникают при отмирании клеток без существенного разрушения пектина и размягчения пораженной ткани.

В зависимости от окраски пораженной ткани различают белую или розовую гниль (возбудители — виды родов *Sclerotinia*, *Trichothecium*, *Fusarium*), черную (виды родов *Thielaviopsis*, *Pythium*), серую (виды родов *Botrytis*).

Пятнистости, или некрозы. Характеризуются отмиранием отдельных участков ткани, резко ограниченных от здоровых тканей, с изменением их окраски. Наиболее распространена округлая форма некротических

пятен, обусловленная равномерным отмиранием клеток, окружающих место заражения и опробковением оболочек.

Основные возбудители — виды родов *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Alternaria*.

Изъязвления (антракнозы) — пятнистости. Характеризуются размягчением тканей, окружающих места заражения, вследствие чего образуются углубления, содержащие спороношение паразита. На листьях они проявляются в виде желтоватых или коричневых, преимущественно округлых крупных пятен, на плодах — в виде язв.

Возбудители — виды родов *Colletotrichum*, *Gloesporium*.

Грибные налеты. Образуются в результате развития мицелия и спороношения грибов на поверхности пораженных листьев, стеблей и других органов растений. Налет может быть представлен рыхлым или более плотным скоплением мицелия и спороношения гриба белого (мучнистая роса) или бурого цвета. Иногда налет состоит только из конидиальных спороношений гриба, выступающих из устьиц, а мицелий заключен в тканях пораженного растения. Это заболевание носит название ложной мучнистой росы.

Возбудители — виды родов *Erysiphe*, *Peronospora*, *Alternaria*.

Пустулы. Представляют собой округлые или овальные, выпуклые подушечки различной величины, состоящие из спороношений гриба. Они образуются всегда внутри ткани листа или другого органа растения и сначала прикрыты эпидермисом (на листьях) или перидермой (на клубнях и стеблях), которые позднее раскрываются.

Возбудители — ржавчинные грибы (*Russinia graminis* и др.).

Мумификация. Заболевания, при которых пораженный грибом орган растения густо пронизан гифами. Чаще всего мумифицируются органы, богатые питательными веществами. Пораженный плод превращается в твердое образование (склероции), кроющие ткани которого окрашены в темный цвет.

Возбудители — виды родов *Claviceps*, *Stromatinia*.

Разрушение отдельных органов растения. Проявляется в том, что пораженные колосья, листья растений под влиянием возбудителя превращаются в порошкообразную массу черного, коричневого или другого цвета, состоящую из спор паразита.

Возбудители — *Ustilago tritici*, *Tilletia* и др.

Израстание. Сопровождается чрезмерным ростом растения вследствие того, что паразитирующие на растении грибы или клетки ткани больного растения выделяют в пораженные ткани ростовые вещества (гиббереллины, ауксины), вызывающие растяжение клеток и усиленный рост.

Основные возбудители — виды рода *Fusarium*.

Чрезмерная кустистость. Сопровождается выделением ростовых веществ возбудителя и образованием дополнительных побегов (так называемых метел), на которые расходуется большое количество питательных веществ и энергии, что приводит к снижению плодоношения растения.

Возбудители — виды рода *Eχοascus*.

Раковые наросты (гипертрофия). Выражаются в чрезмерном разрастании пораженной ткани, образовании опухолей, наростов, галл вследствие выделения грибами веществ, стимулирующих деление клеток. Наблюдаются на всех органах растения. В основе этого процесса лежат два явления: гиперплазия — увеличение количества клеток; гипертрофия — увеличение объема клеток. Иногда эти процессы происходят одновременно.

Возбудители — виды родов *Sphaeropsis*, *Nectria*, *Synchytrium* и др.

Деформация. Проявляется в виде скручивания, морщинистости, курчавости, нитевидности листьев, связанных с нарушением пораженной грибом функции проводящей системы.

Возбудители — виды рода *Taphrina*, *Melampsora*.

Установление причин заболевания при тщательном изучении симптомов является первым условием создания системы эффективных защитных мероприятий по борьбе с болезнями растений.

XVIII.2. КАТЕГОРИИ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ [131, 141, 210, 299, 412, 426]

В основе взаимоотношений между растением и возбудителями болезней лежит явление паразитизма. По локализации паразита различают экзопаразитизм — паразит обитает на поверхности хозяина, эндопаразитизм — паразит живет внутри питающего растения. По степени выраженности паразитизма возбудителей делят на три основные категории.

Облигатные, или обязательные, паразиты. Возбудители болезней, жизненный цикл которых протекает в живом растении. Они способны питаться только за счет живой клетки растения. К ним относятся все возбудители ложной и настоящей мучнистой росы, ржавчины и др. На мертвых остатках растений они проходят только период покоя. Такие грибы трудно культивировать на искусственных питательных средах. В последнее время предложены среды для культивирования отдельных видов (см. раздел XVIII. 9).

Необязательные паразиты. Развиваются на живом растении, но при определенных условиях могут продолжать свое развитие и на отмерших тканях. Это возбудители парши яблони, груши, белой пятнистости, антракнозов. На молодых тканях грибы образуют конидиальную стадию, а на опавших листьях — сумчатую (например, возбудитель парши яблони *Fusicladium dendriticum* Fuck. — конидиальная стадия, *Venturia inaequalis* (Cooke) — сумчатая стадия).

Факультативные паразиты. Развиваются как сапрофиты на мертвых тканях, но способны распространяться и на примыкающие здоровые ткани, убивая их предварительно своими токсинами и другими метаболитами (представители родов *Fusarium*, *Cytospora*, *Botrytis*, *Sphaeropsis*). Сапрофиты (факультативные паразиты) — организмы, питающиеся мертвыми растительными остатками.

Между представителями перечисленных категорий паразитизма существуют многочисленные переходные формы. Так, некоторые виды грибов обычно паразитируют на отдельных видах растений, но часть жизненного цикла проводят, как сапрофиты, другие же большую часть жизни проводят, как сапрофиты, но определенный период паразитируют. Степень паразитизма разных видов облигатных грибов различна. В одних случаях паразит легко внедряется в ткани растения и вызывает его гибель, в других длительное время как бы сосуществует вместе с ним, но при определенных условиях подавляет рост растения.

Узкоспециализированные облигатные паразиты поражают не только определенные виды, но и сорта растений.

XVIII.3. СВОЙСТВА ПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

Способность болезнетворных организмов паразитировать на определенных растениях определяется патогенностью — способностью вызывать заболевание растения и наносить ему определенный вред — и вирулентностью — качественной мерой патогенности того или иного возбудителя по отношению к определенным сортам растения. Один и тот же возбудитель может быть вирулентным для одного сорта и авирулентным для другого. Территория, на которой распространена болезнь, называется ареалом болезни. Особенно сильные вспышки болезни, массовое заболевание растений носит название эпифитотий.

XVIII.4. ВОЗНИКНОВЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Течение инфекционного процесса состоит из трех последовательных этапов: заражения, когда инфекция попадает на поверхность органов растений, грибные споры прорастают; проникновения гриба в растение, когда мицелий прорастает внутрь тканей, и развития патологического процесса. Проникновение может осуществляться через неповрежденную поверхность растения, естественные отверстия (устьица, чечевички) и поврежденную поверхность (раневые инфекции).

Для развития возбудителя необходимы определенные условия: наличие капельно-жидкой влаги, отсутствие фунгистатических веществ в растении, относительно высокая влажность воздуха, температура и другие факторы.

Период болезни от заражения до проявления внешних симптомов заболевания называется инкубационным (скрытым, латентным). Течение его зависит от многих факторов: температуры, влажности, освещенности, цикла развития возбудителя, восприимчивости растения. Например, латентный период при заражении овса эцидиоспорами и уредоспорами возбудителя корончатой ржавчины овса *Puccinia coronata f. avenae* варьирует от 7 до 14 дней при температуре 15—16° С. При более низкой температуре он удлиняется, а при 36° С отсутствует. Переноспороз табака при оптимальных условиях (дневные температуры 17—21°; ночные 8—13° С) проявляется через 3—7 дней.

Первичное заражение происходит от перезимовавшей стадии возбудителя, вторичное — при распространении болезни от одного растения к другому.

XVIII.5. ОБНАРУЖЕНИЕ ГРИБОВ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ [299, 461]

1. Организмы, развивающиеся на поверхности растений, обнаруживают прямым микроскопированием под бинокулярной лупой (увеличение до 50), методом отпечатков, фиксации.

2. Грибы, развивающиеся под кутикулой, обнаруживают путем окрашивания гиф с удалением или без удаления кутикулы. Кутин и межклеточное вещество удаляют последовательным погружением препаратов растительной ткани в растворы кутиназы и пектиназы. Затем препарат окрашивают метиленовым синим; гифы окрашиваются в синий цвет.

3. Эндофитные грибы обнаруживают в продольных и поперечных окрашенных метиленовым синим срезах фиксированных или свежих образцов.

Обычно применяют фиксатор следующего состава: 90 мл 50%-ного этилового спирта; 5 мл ледяной уксусной кислоты; 5 мл формалина. Препараты фиксируют, нумеруют, просматривают под микроскопом, делают серию снимков. Образцы можно хранить в жидкой среде, предварительно обработав их растворами А и Б. Состав раствора А: 100 мл глицерина; 50 г молочной кислоты; 50 г фенола; 20 г ацетата меди; до 1 л водопроводной воды. Состав раствора Б: 50 мл глицерина; 25 мл молочной кислоты; 25 мл формалина; до 1 л водопроводной воды.

Образец погружают на 4—5 дней в раствор А, потом в раствор Б, последний меняют несколько раз до исчезновения голубовато-зеленой окраски. Образец хранят в растворе Б с указанием даты, места сбора растения, патогена. При наличии пикнид или плодовых тел, погруженных в ткани, делают срезы ткани бритвой. Для этого подготовленный кусочек пораженной ткани вкладывают в надрез-расщелину бузины. Срезы ткани помещают в капли воды на предметное или часовое стекло.

ХVIII.5.1. ОБНАРУЖЕНИЕ МИЦЕЛИЯ ПЫЛЬНОЙ ГОЛОВНИ В ЗАРОДЫШАХ

Для отделения зародыша от зерна образцы исследуемых семян помещают на ночь в 10%-ный раствор щелочи (NaOH). Затем отдельные зародыши собирают и промывают несколько раз кипящей водой, обесцвечивают в кипящем лактофеноле (молочная кислота, фенол, глицерин, вода в соотношении 1 : 1 : 1 : 5) в течение 2—3 ч. Лактофенол обесцвечивает зародыши до такой степени, что под микроскопом легко обнаруживается мицелий. Последний обычно окрашивают метиленовым синим (50 г на 100 г лактофенола) при кипячении в течение 2—3 мин с последующей промывкой чистым лактофенолом. Мицелий окрашивается в голубой цвет [210].

ХVIII.5.2. ОБНАРУЖЕНИЕ МИЦЕЛИЯ ПЫЛЬНОЙ ГОЛОВНИ В ПРОРОСТКАХ

Проростки испытывают в стадии 3—5 листьев (в возрасте 14—21 дней). Срезают верхушку стебля, обесцвечивают в течение 15 мин в кипящем лактофеноле, содержащем 0,001—0,005% трипанового синего. Затем точку роста погружают в лактофенол и определяют наличие мицелия пыльной головки под микроскопом.

ХVIII.5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОНИКНОВЕНИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИИ *VERTICILLIUM DANTIAE* — ВОЗБУДИТЕЛЯ УВЯДАНИЯ В ПРОРОСТКАХ ХЛОПЧАТНИКА

Поверхностно простерилизованные семена хлопчатника высевают в чашку Коха или растильню с почвой, предварительно заражая их грибом. Через определенные интервалы времени проростки просматривают визуально и микроскопически на наличие в тканях стебля и листьев гиф гриба, конидий и хламидоспор. Растения фиксируют обычно 70%-ным этанолом и затем окрашивают срезы раствором водного синего в 40%-ной уксусной кислоте.

ХVIII.6. УЧЕТ БОЛЕЗНИ [131]

Маршрутные обследования проводят обычно 3 раза за вегетационный период: полевых и овощных культур — в период появления всходов, в период цветения и перед уборкой; плодовых и ягодных — сразу после цветения, через месяц после цветения и перед уборкой урожая. На стационарных участках наблюдения проводят систематически в течение вегетационного периода каждые 10 дней. Выбор участка, количество учетных растений или делянок, размещение их на площади и т. д. зависят от характера болезни и вида обследуемой культуры. Результаты учета болезней растений выражают следующими показателями.

Распространенность болезни — количество больных растений или органов растений (листьев, плодов, клубней), выраженное в процентах общего числа обследованных растений на участке определенной площади. Определяется по формуле $P = n \cdot 100/N\%$, где N — общее число обследованных растений; n — количество больных растений [131].

Интенсивность, или степень, поражения растений — качественный показатель болезни. Определяется площадью пораженной поверхности растения или отдельных его органов. Выражается либо в процентах, либо в баллах, для чего используют специальные условные шкалы. Наиболее распространена четырехбалльная шкала со следующими градациями:

Балл	Степень поражения поверхности расте- ния, %
0	0
1	10
2	11—25
3	26—50
4	Свыше 50

Развитие, или индекс, болезни выражают в процентах и находят по формуле $R = \Sigma (ab) \cdot 100/NK$, где $\Sigma (ab)$ — сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий им балл поражения (b); N — общее количество просмотренных растений (здоровых и больных); K — высший балл шкалы учета. Индекс болезни отражает среднюю интенсивность поражения (для отдельного растения, сорта, участка или определенной территории).

Учет потерь урожая от болезней [131] — недобор урожая вследствие поражения растений той или иной болезнью. Потери выражают в процентах и вычисляют по формуле $G = (A - a) \cdot 100/A$, где A — урожай здоровых растений; a — урожай больных растений.

ХVIII.7. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ [131, 210, 299, 370, 470]

В большинстве случаев необходимы специальные методы выделения грибов, связанные с особенностями их биологии и свойствами субстрата.

— Поверхностную стерилизацию органов растения применяют для освобождения от флоры, находящейся на их поверхности. Для стерилизации используют сулему в разведении 1 : 1000 (исследуемый объект погружают в раствор на 1—2 мин и затем многократно промывают водой), формалин в разведении 1 : 300 (объект погружают в раствор, а затем выдерживают в парах формалина в течение 30 мин — 2 ч); 0,1—1%-ную

бромную воду (исследуемый объект погружают в раствор на несколько секунд); 3%-ную перекись водорода; 2%-ный раствор марганцевокислого калия — (объект выдерживают в растворе в течение 1—5 мин и многократно промывают стерильной водой). Выбор концентрации дезинфектора и экспозиции зависит от целей исследования и характера исследуемого материала.

Для освобождения от посторонних организмов, главным образом от бактерий, посеvy исследуемых грибов и первичное выделение культур производят на средах с рН 4,0 с добавлением в среду для посева антибиотиков с широким спектром антибактериального действия (стрептомицин и др.).

Метод влажной камеры и его модификации применяют для выделения чистой культуры гриба. В стерильные чашки Петри кладут 2—3 кружка стерильной фильтровальной бумаги, увлажненные стерильной водой (реже жидкой питательной средой). Исследуемый материал, чаще после поверхностной дезинфекции, помещают в чашку и ставят в термостат при соответствующей температуре. За ростом грибов наблюдают под бинокулярной лупой при 20—50-кратном увеличении. При этом представляется возможным выделить из мицелия гриба или его спороношения чистую культуру и в ряде случаев при микроскопировании определить его вид. Пользуясь методом влажных камер, можно создавать различные условия влажности, а при исследовании материала с достаточной влажностью, например плодов, зеленых частей растений, клубней, наблюдать за ростом грибов, не увлажняя фильтровальную бумагу в чашке Петри. Этим методом можно также дифференцированно исследовать разные части изучаемого материала и выделять из них грибы, так как в начальные периоды грибы растут гнездами, скученно и их выделение не представляет затруднений.

ХVIII.7.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ РАЗНЫХ ОРГАНОВ РАСТЕНИЯ

ХVIII.7.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ КОРНЕЙ

Свежевыкопанные корни многократно промывают стерильной водой, отжимают в нескольких слоях стерильной фильтровальной бумаги, отрезками длиной 1—3 см или целиком (у проростков) укладывают на кружки стерильной фильтровальной бумаги в чашках Петри и ставят в термостат при температуре 26° С. Наблюдение за ростом грибов и их выделение производят через 24—48 ч и в последующие дни роста.

Относительную плотность заселения мицелия и численность грибов в прикорневой почве определяют путем растирания определенной навески после многократного смыва стерильной водой. Навеску свежевыделенных корней с приставшими к ним частицами почвы помещают в колбочку со стерильной водой, взбалтывают для освобождения корней от частиц почвы. После многократного промывания водой корни вынимают микологическим крючком, а взвесь почвенных частиц в воде фильтруют и взвешивают для определения массы почвы, приставшей к корням. По разнице между первоначальной навеской и массой почвы определяют массу корней. Смывы в определенном разведении высевают на кислый суслый агар для определения численности и состава видов грибов в прикорневой почве. Растертые корни мерно высевают на кислый суслый агар, подсчитывают число колоний и выделяют культуры. Плотность заселения определяют также на определенной поверхности.

XVIII.7.1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ПОРАЖЕННОЙ ТКАНИ

Скальпелем, прокаленным над пламенем горелки, делают срез поверхностной ткани по направлению от здоровой части к пораженной. На границе больной и здоровой ткани отрезают небольшой кусочек и переносят в пробирку с кислым суслowym агаром.

XVIII.7.1.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Стебли и корни отмывают от почвы, стерилизуют поверхностно, прокаленным скальпелем разрезают стебель поперек на расстоянии 5—15 см от корневой шейки и небольшой участок пораженного, побуревшего сосуда высевают на поверхность кислого суслowego агара; отдельные кусочки ткани помещают во влажную камеру.

XVIII.7.1.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ СТЕБЛЕЙ И ЛИСТЬЕВ

В ряде случаев грибы можно выделить не только из свежего материала, но и из гербарных образцов. Необходимым условием при сборе для этих целей является немедленная фиксация гербарного материала высушиванием, а также предохранение от заражения посторонней микрофлорой. Наиболее приемлемый метод приготовления гербарного материала — немедленное помещение листьев, стеблей или их частей в стерильный пакет из фильтровальной бумаги и высушивание их в этом пакете. После высушивания листьев пакет помещают во второй пакет, также стерильный, но из более плотной бумаги. В таком виде материал можно хранить до исследования.

Материал помещают во влажную камеру, образцы просматривают под бинокулярной лупой. Выделение грибов производят через сутки и более.

XVIII.7.1.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ЗЕРНА ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ И СЕМЯН

При выделении видов грибов, развивающихся во внутренних тканях зерна или семян, пользуются в основном методом влажной камеры. Зерна или семена после поверхностной дезинфекции укладывают на поверхность фильтровальной бумаги с интервалом 0,5—1,0 см; из одной исследуемой партии зерна среднего образца берут 100—1000 зерен. При этом следует принимать во внимание зараженность грибами и их пораженность. Зараженность определяют числом грибных зародышей в определенном количестве зерна; пораженность характеризуется степенью роста тех или иных видов грибов и поражения ими исследуемого субстрата. Зараженность определяют путем посева смыва определенной навески зерна или семян и последующего пересчета количества грибных организмов на единицу массы зерна.

XVIII.7.1.6. ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ КЛУБНЕЙ, ЛУКОВИЦ, КОРНЕПЛОДОВ

Выделение производят непосредственно из исследуемого материала либо после накопления на тканях этих органов мицелия грибов или их спороношения во влажной камере. В том и другом случае необходима поверхностная стерилизация и предварительный отмыв исследуемого материала от частиц почвы. При непосредственном выделении срезают стерильно небольшой кусочек на границе пораженной и здоровой ткани и помещают его на кислый сусловой агар. Для посевов делают серию срезов из разных мест здоровой и в разной степени пораженной ткани.

XVIII.7.2. СЕЛЕКТИВНЫЕ, ИЛИ «ПРИМАНОЧНЫЕ», МЕТОДЫ

Для выделения паразитных фитопатогенных грибов, не растущих на обычных питательных средах, используют растения-индикаторы, чувствительные к поражению, культуру тканей или органов растений, проростки или семена и стерильные среды, приготовленные на их основе. Например, чистая культура *Phytophthora infestans* может быть выделена при культивировании на стерильной ткани клубня картофеля, *Erysiphe graminis* — на проростках ячменя, *Russinia graminis* f. *tritici* — на проростках пшеницы в стадии 2—3 листьев. Моноспоровую культуру можно получить заражением ткани или растения каплей, содержащей одну спору.

XVIII.7.3. МЕТОД ЭЛЕКТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВИДОВ

Метод заключается в погружении в почву чувствительных к специфическим видам стерильных или нестерильных частей растений с последующим изъятием их и микологическим анализом. В этом случае необходимо забирать анализы в разные сроки и помещать во влажную камеру для выделения грибов, осуществляющих первичное заселение погружаемых частей растений.

XVIII.7.4. МЕТОД «КОНТАКТНЫХ СТЕКОЛ»

Метод выделения микроорганизмов непосредственно из места их расположения в почве (метод Росси — Холодного). Стерильные предметные стекла прижимают к трещинам свежей почвы. Через несколько дней стекла встряхивают для освобождения от крупных комочков почвы и помещают на поверхность агаровой среды в чашку Петри стороной, соприкасавшейся с почвой. Выросшие грибы просматривают под малым увеличением микроскопа и после определенного периода инкубации колонии переносят на свежую среду [210].

XVIII.8. ПОДДЕРЖАНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

После выделения культур и своевременной их очистки от посторонних организмов следует поддерживать чистые культуры в жизнеспособном состоянии. Простейший способ поддержания чистых культур — пересев их через определенное время в пробирки на косяки свежей агаровой среды. Периодичность пересевов зависит от вида гриба и определяется временем его выживаемости. Следует учитывать, что длительное выращивание грибов на искусственных средах может привести к изменению их свойств, в частности к потере патогенности или снижению вирулентности.

XVIII.9. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПАТОГЕНОВ **[210, 299, 461, 470]**

Наряду с выбором методов выделения грибов большое значение имеет подбор благоприятных сред для получения чистых культур, поддержания их жизнеспособности в целях дальнейшего изучения. Состав основ-

ных природных синтетических и полусинтетических сред, используемых для культивирования фитопатогенных грибов, приведен в приложении 8.

XVIII.10. СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ [131, 141, 210, 369, 461]

Специализация фитопатогенных грибов — приуроченность их к определенному виду, сорту питающего растения, способность (приспособленность) к паразитированию на одном или нескольких видах, сортах. *Филогенетическая специализация* патогена — избирательная способность его к поражению определенного набора видов питающих растений. Возбудители болезней с широкой специализацией называются широкоспециализированными, например *Sclerotinia sclerotiorum* — возбудитель белой гнили разных культур, *Botrytis cinerea* — возбудитель серой гнили. К узкоспециализированным возбудителям относятся, например, головневые и ржавчинные грибы (*Ustilago*, *Puccinia*) и др.

Приуроченность патогена к определенным тканям или органам в пределах одного растения называется *тканевой, или органотропной, специализацией* (антракноз смородины — *Gloeosporium ribis* (Lib.) Mont. et Desm.; мучнистая роса огурца — *Erysiphe cichoracearum*; кила капусты — *Plasmidiophora brassicae* и др.).

Возрастная онтогенетическая, или возрастно-физиологическая, специализация — это приуроченность гриба к поражению отдельного органа растения определенного возраста. Например, *Sphaerotheca mors-uvae* поражает мучнистой росой только верхушечные молодые листочки крыжовника.

XVIII.10.1. СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ФОРМЫ И РАСЫ [780]

Наличие одинаковых морфологических признаков у паразитов, развивающихся на разных питающих растениях, не исключает существования между ними биологического отличия, заключающегося в приуроченности отдельных форм одного и того же паразита к определенным растениям. Так, например, у стеблевой ржавчины, вызываемой *Puccinia graminis*, известно 10 специализированных форм, у *Fusarium oxysporum* — свыше 80.

Специализированные формы неоднородны и могут состоять из еще более узкоспециализированных физиологических рас. Расы различаются в пределах вида по узкой приуроченности к поражению определенного круга сортов. Физиологические расы определяются по их патогенности к определенным растениям и сортам-дифференциаторам, которые подбирают для отдельных возбудителей с учетом биологических особенностей питающего растения.

Изменение вирулентности отдельных рас фитопатогенных грибов, утрата или приобретение ими патогенных свойств обусловливается амплитудой изменчивости грибов и их адаптацией к различным условиям. Постоянная смена расового состава паразитов в природе зависит от изменения набора возделываемых сортов. Процесс формирования новой расы гриба можно представить в виде двух последовательных этапов. Первый этап — это появление новой расы в результате полового процесса, мутаций, гетерокариозиса или парасексуального процесса. Новая раса становится деятельной при наличии восприимчивого сорта.

Второй этап заключается в вытеснении менее вирулентных рас восприимчивых растений, стабилизации популяции новой расы патогена. Устойчивость растений сохраняется довольно продолжительное время — до максимального накопления и распространения вновь возникшей расы [258].

Внутри физиологических рас различают биотипы, характеризующиеся способностью паразитировать на отдельных сортах.

При изучении расового состава ряда специализированных видов грибов, в частности ржавчинных и головневых, возбудителей мучнистой росы злаков, фитофторы картофеля и томатов, рака картофеля и других болезней, используют наборы сортов-дифференциаторов, которые инокулируют спорами грибов и учитывают характер поражения по шкалам иммунитета. В настоящее время для каждого специализированного возбудителя разработаны методики определения вирулентности по отношению к международному набору сортов-дифференциаторов (см. раздел XV.4.2). При оценке вирулентности рас к разным растениям пользуются следующими показателями: *устойчивость (резистентность)* — способность растений поражаться грибами в очень слабой степени; *выносливость (толерантность)* — способность больных растений не снижать продуктивность или снижать ее незначительно; *восприимчивость* — неспособность растения противостоять заражению и распространению патогена.

Различают вертикальную устойчивость — к нескольким расам возбудителя — и горизонтальную (полевую) — ко всем расам паразита. Устойчивость проявляется в двух формах: аксении и защитной реакции. Аксения — устойчивость, существующая до заражения и препятствующая ему; обуславливается морфологическими, химическими, физиологическими или физиолого-морфологическими особенностями растения. Защитная реакция вырабатывается растением в процессе инокуляции [295].

XVIII.11. МЕТОДЫ ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ [210, 298, 299, 314, 340, 369, 370, 461, 470]

Приемы инокуляции растений довольно разнообразны и зависят от биологии гриба и роли инфекции в патогенезе заболевания, а также от целей исследования (проверка патогенности штаммов, оценка устойчивости сортов и т. п.). Инокуляцию проводят как патогеном, выросшим на искусственной питательной среде, так и спорами природной популяции гриба. Методы инокуляции растений весьма разнообразны. Для разных культур и заболеваний существуют разные методы создания инфекционного фона и способы заражения культур, общими условиями, при которых является соблюдение чистых культур используемого изолята, стандартизация условий культивирования (среда, температура, густота посева, возраст и др.). Для получения сравнимых результатов и выяснения инфекционной нагрузки необходима количественная характеристика инокулята: содержание разных видов спор (макроконидий, микроконидий, хламидоспор) в единице массы или объема используемой культуры.

Споровый материал для заражения может быть получен из гербария естественно зараженного растения (головня, ржавчина, мучнистая роса) и при культивировании гриба. В первом случае споровый материал

собирают в зависимости от способа спорообразования (плодовые тела базидиальных и сумчатых грибов, спорангиоспоры, конидии на мицелии, в спородохиях, коремиях, пикнидах и т. д.) и локализации гриба в растении на стерильную бумагу или в чашки Петри с соблюдением стерильности для предохранения загрязнения исходного материала вторичной микрофлорой. Плодовые тела или стерильно собранные споры переносят препаровальной иглой в стерильную пробирку или чашку с водой и, освободив споры от плодовых тел, получают взвесь спорового материала, а после удаления воды — сухой споровый материал.

Заражение через почву для создания инфекционного фона включает следующие приемы: приготовление и стерилизацию почвы, заражение ее грибами и равномерное размешивание (учитывается количество конидий и хламидоспор в 1 г зараженной почвы), выращивание проростков здоровых растений, их посадку в сосуды с зараженной почвой. Затем сосуды равномерно увлажняют и помещают в камеры или вегетационный домик при соответствующей для данного вида растения температуре и освещении.

Заражение семян осуществляется путем опыливания сухими спорами, опрыскивания водной взвесью конидий или погружением в нее семян незадолго до посева.

Заражение поврежденных и неповрежденных тканей также производят взвесью конидий путем опрыскивания, нанесения кисточкой, опыливанием сухими конидиями или втиранием их массы. Для получения зараженных семян инокулируют цветы.

Заражение через сосудистую систему производят введением шприцем взвеси инокулюма в сосудистую систему или нанесением инокулюма на разрез стебля, обычно у его основания, на расстоянии не выше 10 см от уровня почвы.

Заражение плодов и корнеплодов производят путем нанесения суспензии спор патогена на их стерильную поверхность. Можно использовать сухие споры, прокалывая или надрезая кожицу плода, или вводить водную суспензию шприцем под кожицу.

Заражение штаммов плодовых деревьев проводят в срезы на коре, сделанные с интервалом 1—1,5 см. Между двумя поперечными надрезами разрезают кору посередине в продольном направлении, отгибают ее и в неглубокие надрезы древесины вносят культуру патогена вместе с кусочком агаровой среды. Затем створки коры закрывают и место заражения обтягивают полиэтиленовой пленкой или пергаментом, закрепляя края шпагатом или клейкой лентой.

Заражение листьев используют при работах с ржавчинными, головневыми, мучнисторосяными грибами. Растения помещают во влажную камеру (100%-ная относительная влажность) для стимулирования прорастания спор и заражения. В полевых опытах зараженные растения закрывают стеклянными колпаками. Среди факторов, способствующих развитию заболеваний, большое значение имеет плотность популяции фитопатогенного вида в почве.

Плотность популяций — это число зародышей патогена на 1 г почвы или заселяемого растительного субстрата. Численность популяции гриба, как правило, снижается в направлении от корней (особенно пораженных) к почве ризосферы и почве без растения и при гибели растения резко возрастает. Увеличение численности популяции фитопатогенных видов тесно коррелирует с увеличением потенциала инокулюма, т. е. с числом форм в популяции, обладающих вирулентными свойствами к определенным растениям. На потенциал инокулюма в почве влияют корневые выделения растений, длительность культивирования растений,

характер растительных остатков, антибиотические вещества микроорганизмов — явления фунгистазиса почвы в целом (фунгистазис — способность нестерильной почвы ингибировать прорастание спор грибов, лизировать ростковые трубки и мицелий).

Популяция того или иного вида гриба в ризосфере и на корнях растений состоит из изолятов, обладающих различными физиолого-биохимическими особенностями. Культуры, выделенные из разных растений, и моноспоровые отличаются интенсивностью роста мицелия и спорообразования, способностью синтеза ферментов (пектиназ, целлюлаз и др.), фитотоксинов, стимуляторов роста растений, витаминов группы В и других физиологически активных соединений. При этом одни изоляты образуют комплекс этих метаболитов в определенной последовательности в разных фазах роста, другие — только отдельные из них. Физиологические свойства отдельных изолятов грибов в некоторой степени определяют характер их воздействия на растение — стимуляцию корнеобразования, роста и патологическое действие, приводящее к заболеванию растения.

XVIII.12. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Обширная и сложная программа исследований биологических свойств грибов — возбудителей болезней растений — является одним из этапов научной разработки эффективных средств защиты растений. Она включает изучение особенностей морфогенеза возбудителей, влияния внешних факторов, компонентов питательной среды на их рост и развитие, определение характерных биохимических свойств организмов в лабораторных условиях. Так, например, у видов рода *Fusarium* установлены следующие морфогенетические особенности: разнообразие типов спороношения (микро- и макроконидии), определенные их соотношения в изоляте (популяции). Микроконидии предназначены главным образом для массового заселения субстрата, они многочисленны, но не переживают в почве, в то же время у разных изолятов они разнокачественны (по морфологии, размерам, физиологической зрелости, жизнеспособности).

Особое значение для сохранения видов грибов имеют переживающие в почве структуры фитопатогенных видов, прежде всего мицелиальные и конидиальные хламидоспоры, а также фрагменты мицелия с клетками хламидоспорового типа, склероции, мицелиальные тяжи. Они устойчивы к воздействию различных факторов — температуры, влажности, действию фунгицидов и др. Эти структуры существуют как в сапрофитной фазе, так и в тканях пораженного растения. Наличие переживающих структур создает потенциальную инфекционность, что может быть причиной увеличения численности инокулюма в сапрофитной или факультативно-паразитной фазе, образования рас, резистентных к фунгицидам и вирулентных. В связи с этим для фитопатологической характеристики отдельных видов грибов существенное значение имеет определение наличия и способности к прорастанию различных морфологических структур: конидий, хламидоспор, клеток мицелия склероциев в почве, тканях растения и растительных остатках. Способность к прорастанию нередко ингибируется споростазисом — образованием в почве веществ различной природы, иногда летучих, ингибирующих процесс прорастания.

Выяснение физиолого-биохимических механизмов действия патогена на растение позволяет объяснить многие проявления его агрессивности. Обычно действие патогена обусловлено комплексом свойств гриба и растения. Так, при фузариозах сельскохозяйственных растений физиолого-биохимическое воздействие осуществляется двумя основными путями — ферментативным и токсигенным, хотя часто они взаимосвязаны и взаимообусловлены.

Ферментативная активность гриба связана с проникновением его в ткани и клетки, т. е. с разрушением полимеров клеточной оболочки и межклеточного вещества растений — кутина, пектина, целлюлозы, гемицеллюлозы и др. Потребность в источниках углерода обеспечивается за счет ферментативного расщепления этих полимеров, освобождения легкоусвояемых мономеров, обеспечивающих интенсивный рост и спороношение гриба в пораженном растении. Путь ферментативного расщепления существенно нарушает процессы метаболизма растения, связанные с образованием клеточной оболочки и межклеточного вещества. Токсигенность, или фитотоксичность, патогена — это способность его образовывать более или менее видоспецифические вещества, ингибирующие отдельные метаболические процессы растения, снижающие его устойчивость, урожай или вызывающие его гибель.

ХІХ. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ

ХІХ.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ В ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ

ХІХ.1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Почвенные грибы — обширная и сложная экологическая группа организмов. Среди них имеются представители, поражающие насекомых, нематод, корни растений; многие виды развиваются на экскрементах животных, растительных остатках; известны грибы-микоризообразователи. Таким образом, большинству грибов, обитающих в почвах, свойственна приуроченность к определенному субстрату. Эту особенность широко используют микологи при выделении некоторых видов и групп грибов в чистые культуры на питательные среды. Предложено большое количество питательных сред, содержащих различные источники углерода и азота. Подробные сведения о них изложены в работах [51, 53, 71, 264, 353]; ниже приведен состав только некоторых, в основном редко применяемых питательных сред.

ХІХ.1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ ИЗ ПОЧВЫ

Для выделения грибов из почв обычно используют твердые (агаризованные) питательные среды с легкодоступными источниками углерода — сахарозой, глюкозой, декстрозой. К таким средам относятся агаризованная среда Чапека, картофельно-декстрозный агар, агаризованное пивное сусло. С помощью этих питательных сред обнаруживают и учитывают в основном быстрорастущие и обильноспороносящие таксоны (виды *Penicillium* Link ex Fr., *Aspergillus Micheli* ex Fr. и др.).

ХІХ.1.2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ НА СЕЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ

При экологическом анализе микофлоры почв, т. е. учете грибов, приуроченных к определенным субстратам, применяют разные селективные питательные среды. Так, целлюлозоразрушающие грибы изолируют на питательные среды, содержащие целлюлозу (фильтровальную бумагу) или же синтетические среды с целлюлозой либо карбоксиметилцеллюлозой. Для выделения грибов на фильтровальную бумагу последнюю нарезают полосками, складывают продольными складками («гармошкой») и помещают в пробирки. Потом в каждую пробирку добавляют 2—3 мл жидкой среды Чапека или Гетчинсона без источника углерода и стерилизуют 30 мин при температуре 115° С. Грибы, способные разлагать лигнин, изолируют на питательные среды с лигнином [307]. Для обнаружения в почве грибов, принимающих участие в разложении гумуса, к питательным средам прибавляют в качестве источ-

ника углерода и азота гумат натрия. Эти же грибы можно выделять и на почвенный агар — вытяжку почвы с агаром. Для этого необходимое количество воздушно-сухой измельченной почвы (например, 500 г) заливают водой (1 л), настаивают сутки периодически взбалтывая, затем кипятят 30 мин и фильтруют через 1—2 слоя фильтровальной бумаги, после чего восстанавливают прежний объем жидкости, устанавливают нужный уровень рН однозамещенным фосфорнокислым калием, добавляют агар-агар (15—20 г), разливают в посуду и стерилизуют. Грибы, которые могут расти в условиях дефицита органических веществ, выделяют на голодный агар, который готовят из расчета 15—20 г агар-агара на 1 л воды. Предложены также питательные среды, предусматривающие выявление в почве определенных групп грибов. Так, например, виды *Fusarium Link. ex Fr.* выделяют на агаризованную среду, содержащую пентахлорнитробензол (0,5 г на 1 л среды).

В почвах грибы находятся в ассоциациях с другими организмами. Поэтому для подавления роста некоторой сопутствующей флоры, например бактерий, питательные среды следует подкислять либо добавлять к ним антибиотики. Для этих целей используют соляную, серную, лимонную, фосфорную кислоты. Кислоты к средам добавляют до тех пор, пока рН пробной порции не достигнет значений 4,2—4,5. Более высокая кислотность может оказывать угнетающее действие на рост многих грибов. Среды обычно подкисляют перед добавлением агар-агара. Некоторые кислоты, например лимонную, добавляют после стерилизации, причем на каждые 5 мл среды прибавляют 1 каплю 50%-ного раствора кислоты. Кислоты можно заменить бенгальской розовой (кислотный ксантеновый краситель) в концентрации 1 : 15 000 [692] или антибиотиками. Применяют следующую дозировку антибиотиков: 1 000 000 ед. пенициллина растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды и к каждому литру питательной среды добавляют 2 мл полученного раствора; 1 000 000 ед. стрептомицина растворяют в 90 мл стерильной дистиллированной воды, после чего 4 мл раствора прибавляют к 1 л питательной среды. Антибиотики добавляют к питательным средам после автоклавирования [286].

ХІХ.1.2.2. МЕТОД ПОЧВЕННЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

Грибы изолируют из почв на питательные среды разными методами. Один из наиболее простых — метод почвенных разведений Ваксмана [824], заключающийся в посеве почвенной суспензии на питательные среды. Этим методом пользуется большинство микологов. Анализ микофлоры почв методом почвенных разведений осуществляют следующим образом. Образцы почв, отобранные в зоне корневой системы растений (ризосфера) или на участках, лишенных растительности, просеивают через сито с отверстиями диаметром не более 4 мм между двумя листами стерильной бумаги *. Затем между этими же листами бумаги смешивают образцы 2—3 проб и быстро готовят среднюю пробу. Обеспечивая максимум стерильности, смешанную почву взвешивают на технических весах, обычно по 10 г, в 3—4 повторностях, насыпая ее на стерильные кружки бумаги шпателем. Для каждого образца берут новый кружок бумаги, а шпатель обмывают водой, вытирают насухо, погружают в банку со спиртом и обжигают, проводя через пламя горелки. Навески почвы переносят в предварительно подписанные стерильные колбы,

* Образцы почв отбирают в стерильные пробирки или бумажные пакеты из двухслойной пергаментной бумаги.

содержащие по 90 мл стерильной воды, и в течение 5 мин встряхивают. Далее 1 мл суспензии переносят из колбы в стерильную пробирку с 9 мл стерильной воды и слегка взбалтывают. Таким же образом 1 мл суспензии из этой пробирки переносят в следующую пробирку и т. д. Из пробирки третьего или четвертого разведения 1 мл суспензии высевают в стерильные чашки Петри (рис. 128). Посев из каждой пробирки производят в 3 или 4 чашки. Затем в чашки Петри стерильно (над пламенем горелки) наливают по 10 мл расплавленной, охлажденной до 40° С агаризованной питательной среды, после чего ее перемешивают осторожным покачиванием, прежде чем остынет агар, и ставят в термостат для инку-

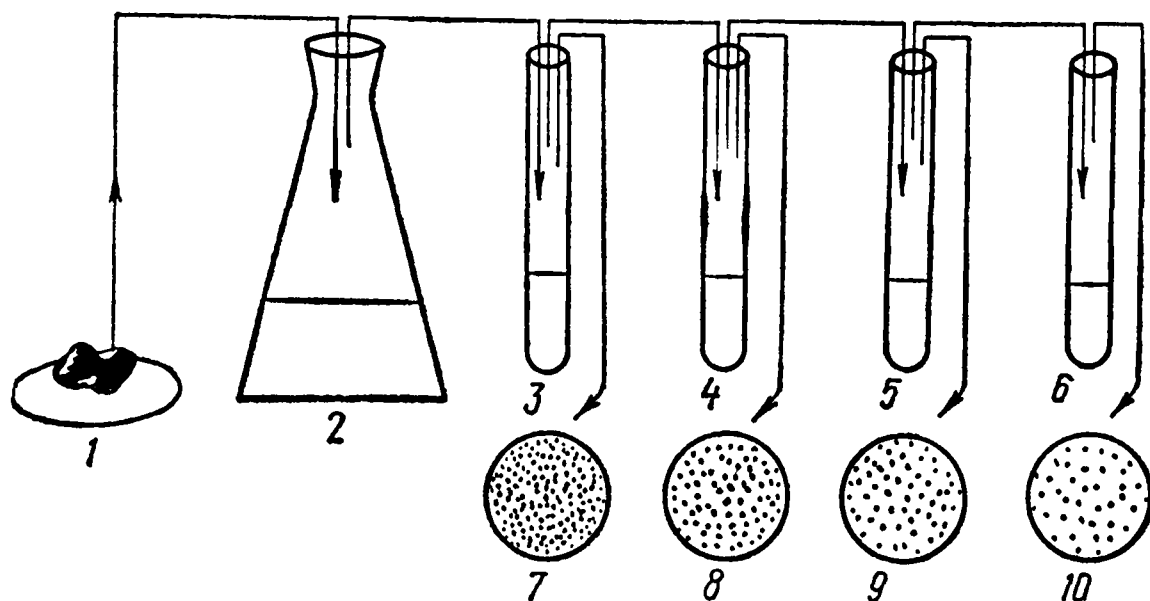


Рис. 128. Схема приготовления почвенных разведений и посева почвенных грибов в чашки Петри:

1 — стерильная бумага с 10 г почвы; 2 — колба с 90 мл воды; 3—6 — пробирки с 9 мл воды; 7—10 — чашки Петри с разным разведением суспензии спор.

бации при температуре 23—25° С на 10—15 сут. Для более полного выявления видового состава почвенных грибов следует применять несколько различных агаризованных питательных сред, в том числе и сред, предусматривающих изолирование определенных экологических групп грибов.

Засеянные водно-почвенной суспензией чашки Петри периодически просматривают, обычно начиная с третьих суток, и отдельные колонии грибов в случае их интенсивного разрастания отвивают в пробирки на агаризованную питательную среду. Окончательный учет проводят через 10—15 сут. При этом подсчитывают общее число выросших колоний, условно допуская, что каждая колония образовалась из одной споры или клетки гифы. Учет изолированных грибных зародышей (спор, фрагментов гиф) изложен ниже.

Метод почвенных разведений Ваксмана удобен для характеристики грибной флоры почв разных типов, почв различных растительных ассоциаций, изучения влияния удобрений или других агротехнических мероприятий на видовой состав грибов.

ХІХ.1.2.3. МЕТОД ПРЯМОГО ПОСЕВА ПОЧВЫ

Для выделения грибов методом прямого посева [825] небольшие образцы почвы (0,005—0,015 г) берут из средней пробы стерильным ланцетом и смешивают с каплей стерильной воды на дне чашки Петри. В эту же чашку добавляют 8—10 мл охлажденной агаризованной питательной среды и частицы почвы равномерно распределяют по всей поверхности легким покачиванием чашки.

ХІХ.1.2.4. МЕТОД ПРЯМЫХ ОТПЕЧАТКОВ ПОЧВЕННОЙ ПРОБЫ

Край пенополиуретанового цилиндра длиной 40 мм и диаметром 15 мм увлажняют агаризованной питательной средой, путем соприкосновения с ее поверхностью [806]. Затем увлажненный край цилиндра прижимают к подсушенному почвенному образцу и этим же краем делают 10 последовательных отпечатков на поверхности питательной среды в чашках Петри, которые ставят в термостат для инкубации. Метод прямых отпечатков почвенной пробы прост и легко выполним.

ХІХ.1.2.5. ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ГРИБОВ

Метод основан на способности диэлектриков притягивать положительно заряженные мелкие частицы [227]. Для этого из фторопласта изготовляют круглые пластинки диаметром 4 см, обрабатывают их антисептиком — метиловым спиртом, избыток которого удаляют стерильной фильтровальной бумагой. Подсушенные пластинки электризуют трением о стерильную фильтровальную бумагу. Наэлектризованные пластинки подносят к рассыпанному ровным слоем почвенному образцу не ближе 2—3 см, чтобы избежать притяжения крупных частиц. Притянутые к пластинкам мельчайшие частицы отпечатывают на агаризованных средах в чашках Петри. Электростатический метод дает возможность изолировать значительно большее число видов грибов, чем метод почвенных разведений.

ХІХ.1.2.6. МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ГРИБОВ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ ОСТАТКИ

Метод выращивания грибов в условиях, приближенных к естественным [264]. Измельченную стерню злаковых, головки цветков клевера и т. п. помещают в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу и стерилизуют. Затем на них высевают исследуемую почву и по мере появления колоний грибов отвивают последние на питательные среды. Метод предусматривает обнаружение в почвах многих медленно-растущих грибов, в том числе и сумчатых.

ХІХ.1.2.7. МЕТОД ФУМИГАЦИИ ПОЧВЫ

Этим методом рекомендуют изолировать сумчатые грибы [826, 830]. Он основан на применении веществ, обладающих значительной токсичностью и летучестью — формалин, метилбромид, хлорпикрин и др. Пары указанных ядохимикатов легко диффундируют в исследуемые образцы и вместе с тем быстро могут быть удалены из них проветриванием. Просеянную через сито почву помещают в стеклянную трубку, на поверхности которой имеется несколько отверстий (рис. 129). В трубку вводят нужную дозу ядохимиката и все отверстия закрывают резиновыми пробками, которые после нескольких часов экспозиции заменяют ватными. Обработанную таким способом почву высевают на агаризованную питательную среду. Дозировка ядохимиката и экспозиция зависят

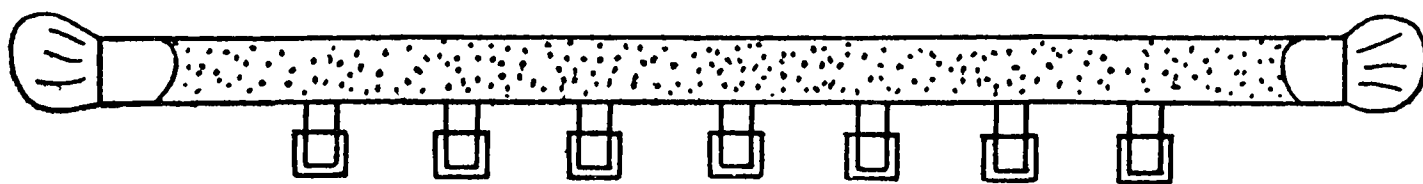


Рис. 129. Стеклянная трубка с отверстиями, применяемая в методе фумигации почвы.

главным образом от типа почвы и вида гриба. Например, виды *Sordaria* Ces. et de Not. и *Thielavia* Zopf из песчаной почвы лучше всего выделяются при обработке ее метилбромидом в концентрации 0,6 мл на 1000 мг почвы с экспозицией 4 ч, а виды *Chaetomium* Kunze ex Fr.— при концентрации 0,6—0,8 мл.

ХІХ.1.2.8. МЕТОД ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ

Сумчатые грибы можно выделять также методом тепловой обработки почвы [827]. Образцы почв прогревают паром при 60—65° С в течение 30 мин, помещают на агаризованную питательную среду непосредственно или выделяют грибы методом почвенных разведений Ваксмана. Методы выделения темноцветных гифомицетов посредством облучения УФ-лучами почвенной суспензии [726] и грибов с крупными спорами посредством центрифугирования почвы [723] трудоемки, требуют специального оборудования, ввиду чего ими редко пользуются. Подробное описание указанных методов приведено в [299].

ХІХ.1.2.9. МЕТОД ПРИМАНКИ

Приманки применяют для обнаружения в почве видов, которые не изолируются на питательные среды из-за угнетения их быстрорастущей флорой и выделения некоторых экологических групп грибов. В качестве приманки используют семена конопли, крылья насекомых, экскременты крыс, мышей, кроликов, рога и копыта животных, перья птиц и т. п. Суть этого метода заключается в следующем. Почву слегка увлажняют и рассыпают по дну стерильной чашки Петри. Затем сверху раскладывают простерилизованный субстрат — приманку. После чего чашки Петри помещают во влажную камеру, периодически просматривают и появившуюся грибницу отвивают в пробирки на питательную среду. Для выделения из почв копрофильных грибов обычно используют экскременты животных, кератиноразрушающие грибы изолируют на обезжиренный стерильный волос, виды рода *Fusarium* — на стерильные ломтики картофеля. Обитающие в почве хитридиевые, сапролегниевые и другие грибы, образующие зооспоры, чаще всего выделяют на семена конопли, кусочки вареных яиц, мертвых насекомых и т. д. Осуществляют это следующим образом. В стерильные чашки Петри кладут по 10 г исследуемой почвы, заливают стерильной водой, добавляют приманку (желательно несколько разных видов) и ставят в термостат для инкубации.

Другая группа методов предусматривает применение стеклотехники разной степени сложности для обнаружения и выделения грибов, находящихся в почве в активном состоянии. К ним относятся метод выращивания стекол Холодного [541], метод предметных стекол-ловушек Ля-Туш [664], методы решетчатых экранизирующих погруженных пластинок [800], капиллярных педоскопов [348], погруженных (иммерсионных) трубок Честерса [540]. Кроме того, имеется ряд модификаций указанных выше методов, которые содержат лишь частичные видоизменения и сводятся в основном к покрытию разного рода стеклянных устройств питательной средой [71, 394, 715, 767]. Суть этих методов сводится к тому, чтобы в отверстия в стеклянных устройствах разной степени сложности смог проникнуть растущий мицелий гриба. Ввиду того что всеми перечисленными выше методами можно выполнить сравнительно небольшой объем работы и они не позволяют изолировать и идентифицировать отдельные виды грибов, мы на них не останавливаемся. Эти методы детально изложены в [299].

ХІХ.1.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ С КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ И ДРУГИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ

ХІХ.1.3.1. МЕТОД ВОДНЫХ СМЫВОВ

Большинство почвенных грибов аккумулируется вблизи корней растений. С поверхности корней растений и почвы, находящейся в непосредственной близости от них, грибы обычно изолируют методом водных смывов [315]. Этот метод пригоден и для выделения грибов с поверхности опавших листьев, валежника и других растительных остатков. С корней или других растительных остатков осторожно стряхивают почву, ножницами, предварительно погруженными в банку со спиртом и обожженными над пламенем горелки, разрезают корни на отрезки 3—5 см, которые стерильным пинцетом переносят (обычно по 3—4 отрезка) в заранее подписанные колбы, содержащие по 100 мл стерильной воды, и встряхивают в течение 5 мин. Затем по 1 мл полученной суспензии высевают в чашки, предварительно приготовив нужное разведение (приготовление разведений см. в разделе ХІХ.1.2.2.). Суспензию 3-го или 4-го разведения разливают в 3 или 4 чашки Петри по 1 мл в каждую, заливают расплавленной, но охлажденной агаризованной питательной средой и перемешивают легкими покачиваниями до остывания агара. После этого чашки Петри ставят в термостат для инкубации. Оставшуюся в колбе водную суспензию почвы осторожно отфильтровывают через предварительно взвешенный и надписанный бумажный фильтр, который высушивают до постоянной массы для определения сухой массы почвы, смытой с поверхности корней. В колбу с корнями повторно вливают 100 мл стерильной воды, с которой поступают так же, как и с первой порцией. Обычно делают 5—10 смывов. На питательные среды в чашки Петри чаще всего высевают разведения 1-го, 5-го и 10-го смывов. Основная масса грибных зародышей отделяется с корней в первые смывы. После 10 смывов грибных зародышей на поверхности корней остается мало.

Метод водных смывов с растительных остатков прост, удобен и позволяет без особого труда выделять большое количество грибов разных видов.

ХІХ.1.3.2. МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ СПОР СУХОСПОРОВЫХ СУМЧАТЫХ ГРИБОВ

Выделение в чистые культуры аскоспор сумчатых грибов, плодовые тела которых развиваются на поверхности или внутри растительных и каких-либо других тканей, например на корнях растений, затруднено сильным инфицированием образцов бактериями, сапрофитными быстрорастущими грибами и другими организмами. Стерилизация образцов химическими веществами или пламенем, как правило, убивает и исследуемые объекты, а многократная промывка стерильной водой обычно не дает желательных результатов. Предложен [212] метод получения спор сухоспоровых сумчатых грибов с последующим перенесением их на питательные среды, рассчитанный на виды грибов с активным споротделением, плодовые тела которых снабжены отверстием. Этим методом можно получать также споры базидиальных грибов с открытым гименофором и односпоровые культуры разных видов грибов. Метод не пригоден для выделения грибов, споры которых погружены в слизь или плодовые тела лишены отверстия.

Для проведения опыта необходимо брать свежие образцы со зрелыми плодовыми телами. Поверхность образцов (корни, листья или другие объекты) осторожно очищают от растительных остатков и частичек почвы стерильным пинцетом. На дно стерильных чашек Петри или Коха диаметром 10—18 см ставят несколько маленьких чашечек для тканевых культур диаметром 4—5 см, сняв предварительно с них крышки (крышки маленьких чашечек можно разместить в других больших чашках). Маленьких чашечек ставят столько, сколько может поместиться в больших. Исследуемые образцы с плодоношениями грибов (корни, листья, стебли растений) кладут так, чтобы каждый образец лежал на краях маленьких чашечек, не дотрагиваясь до дна, для предохранения его от

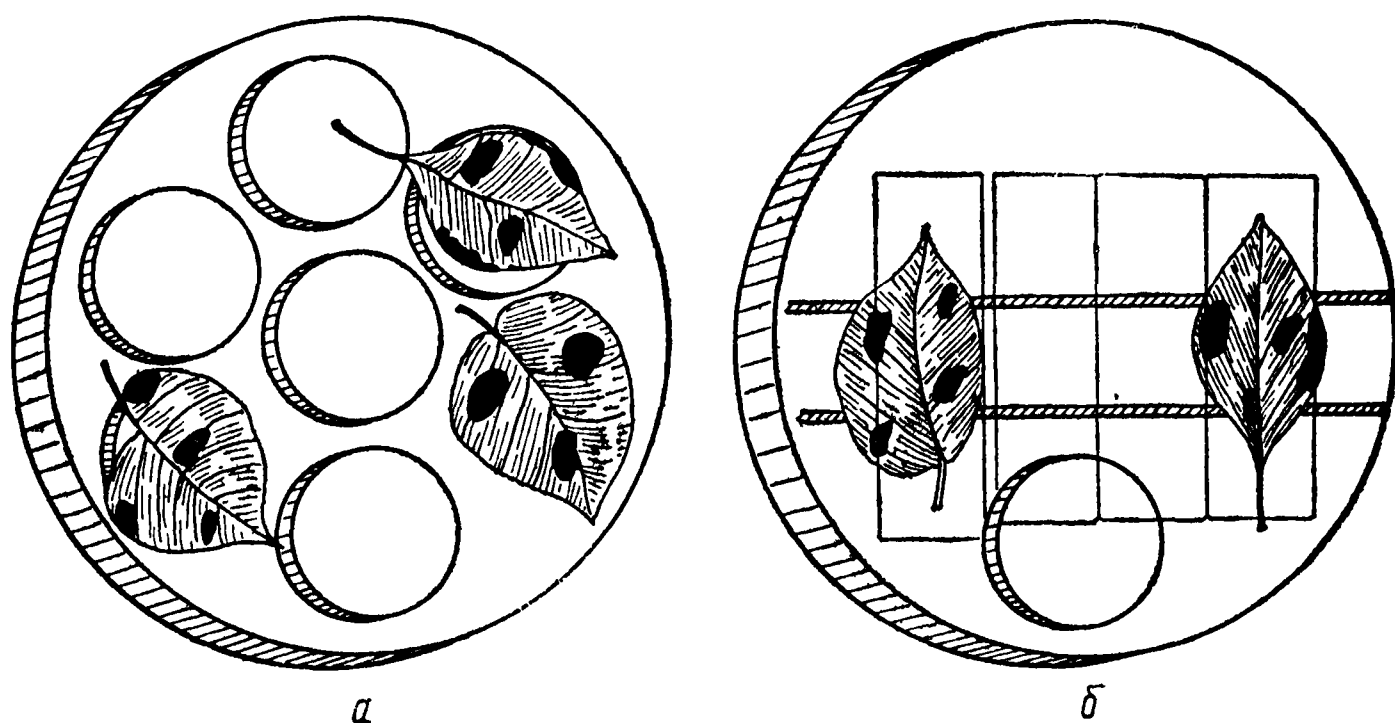


Рис. 130. Расположение чашек Петри при получении спор сухо-споровых сумчатых грибов:

а — с маленькими чашечками; *б* — с предметными стеклами и стеклянными палочками.

засорения (рис. 130). При этом плодовые тела аскомицетов обязательно должны располагаться отверстиями вниз. Экскременты животных следует раскладывать на стерильную сетку с крупными отверстиями — металлическую или лучше волосяную, положенную на чашечки. Образцы накрывают 2—3 слоями кружков или полосок стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной стерильной водой из пипетки. Чашку Коха или Петри накрывают крышкой. Параллельно закладывают опыт без увлажнения фильтровальной бумаги, но для повышения относительной влажности воздуха в одну из чашечек наливают стерильную воду. Если маленьких чашечек для тканевых культур нет, можно использовать стерильные предметные стекла. В этом случае на дно больших чашек кладут предметные стекла, на которые помещают стерильные палочки, а на них — исследуемые образцы. Рекомендуется использовать стеклянные палочки. Наносить тонкий слой питательной среды на дно маленьких чашечек или на предметные стекла нежелательно, потому что на нее могут попасть споры быстрораствующих грибов, засоряющие поверхность.

Через определенный промежуток времени (3—48 ч, в зависимости от целей опыта) снимают крышку чашки Коха или Петри, вынимают маленькие чашечки, ставят их на столик микроскопа и под малым увеличением находят одиночные споры. Под эти же образцы можно помещать другие маленькие чашечки, повторяя процесс несколько раз, если нас

интересует продолжительность высыпания спор с плодовых тел. Затем иглу прокалывают над огнем, охлаждают, погружая в питательную среду, и под контролем микроскопа, коснувшись увлажненным кончиком иглы поверхности споры, переносят ее на питательную среду в пробирку или чашку Петри. Вокруг спор часто образуются капли воды, которые необходимо удалить, так как взять споры на кончик иглы с капли воды трудно. Для этого чашки со спорами на несколько минут оставляют открытыми под стеклянным колпаком.

При выделении спор базидиальных грибов с открытым гименофором плодовые тела или частички плодовых тел кладут гименофором вниз на края маленьких чашечек, а в одну из чашечек наливают воду. Если плодовые тела базидиальных грибов большие, то чашки Петри или Коха накрывают не крышками, а стеклянным колпаком или цилиндром. Маленькие плодовые тела раскладывают на сетку. Гименофор мягких плодовых тел не должен сминаться. Ножку плодовых тел перед закладкой опыта необходимо удалить.

Предложенный метод можно использовать для получения односпоровых культур гифальных грибов, у которых споры опадают пассивно, особенно видов *Penicillium*, *Aspergillus* и др. Грибы выращивают на питательных средах в чашках Петри крышкой вниз. На дно крышки ставят открытые маленькие чашечки или предметные стекла. После того как образуются колонии и спороношение грибов, чашку необходимо слегка встряхнуть, чтобы споры упали в чашечки. Споры стерильно иглой переносят на питательную среду, под малым увеличением микроскопа.

ХІХ.1.4. УЧЕТ ГРИБОВ

Методы выделения грибов на питательные среды, в том числе и метод разведения почвенных суспензий, не дают полного представления об истинном составе грибных зародышей в почве, однако представляют значительный интерес, особенно для учета видов, которые могут расти на питательных средах. Более точные данные о количественном содержании грибных зародышей в почве дают методы прямого микроскопирования.

Методы учета грибов при выделении на питательные среды. При выделении грибов из почв методом разведения почвенной суспензии учет количественного содержания грибных зародышей производят следующим образом. В каждой чашке Петри, засеянной почвенной суспензией, вычисляют общее количество колоний грибов и находят среднее арифметическое. Количество грибных зародышей рассчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы * по формуле $A = abv/g$, где a — среднее количество колоний грибов в чашках Петри; b — разведение, из которого сделан посев; v — масса влажной почвы; g — масса сухой почвы. Частоту встречаемости отдельных видов определяют по числу образцов, в которых встречается данный вид, выраженному в процентах общего числа образцов: $p = n \cdot 100\% / N$, где n — количество образцов, в которых обнаружен данный вид; N — общее количество исследованных образцов.

Для определения общности видового состава грибов в почвах двух разных типов или почвах различных растительных сообществ вычисляют *коэффициент общности* по формуле Жаккара:

$K = a \cdot 100\% / [(v + c) - a]$, где a — число общих видов; v — число

* Для определения влажности почвы из отобранных образцов взвешивают по 10 г почвы и высушивают при температуре 105° С до постоянной массы. Влажность почвы определяют по формуле, приведенной в [71].

видов в почве первого растительного сообщества; c — число видов в почве второго растительного сообщества.

Для характеристики *показателя сходства видового состава* грибов двух типов почв пользуются формулой Серенсена [336]: $S = 2C/(A + B)$, где A — число видов в почве первого растительного сообщества; B — число видов в почве второго растительного сообщества; C — число видов, общих для обоих растительных сообществ.

Зависимость между количественным содержанием в почве определенных видов грибов и внесением каких-либо удобрений или погодными условиями — влажностью, температурой — устанавливают посредством *коэффициента корреляции* [117], который рассчитывают по формуле $r = \Sigma (x - \bar{x})(y - \bar{y}) / \sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2 \Sigma (y - \bar{y})^2}$, где x — количество определенных видов грибов в почве; y — численный показатель изучаемого признака (фактора); $\bar{x}$ и $\bar{y}$ — средние показатели содержания в почве определенных видов грибов и изучаемого признака (фактора). Если зависимость прямая, величина r положительная, а при обратной зависимости — отрицательная. Коэффициент корреляции может колебаться от 0 до 1. Абсолютное значение коэффициента корреляции никогда не превышает 1. Значение r до 0,3 указывает на слабую степень связи, 0,3—0,7 — умеренную, выше 0,7 — тесную зависимость признаков.

Методы учета грибов путем прямого микроскопирования. В капле почвенной суспензии под микроскопом подсчитывают общее число спор и кусочков гиф грибов [93]. Чтобы облегчить подсчет количества грибных зародышей, в окуляр микроскопа вставляют специальную сетку с делениями в условных единицах. Для получения точных результатов подсчитывают 100 полей зрения окулярной сетки. Основным недостатком метода — отсутствие расчета грибных зародышей в навеске почвы.

Модификация этого метода — **метод агаровых пленок** [307]. Навеску почвы растирают в ступке и переносят в 100 мл охлажденной 1,5 % -ной агаризованной питательной среды; капли суспензии среды помещают в камеру Горяева, накрывают покровным стеклом и под микроскопом подсчитывают количество грибных зародышей. Для облегчения подсчета препараты обычно красят карболовым эритрозином или другими красителями. Рекомендуют также по 1 мл суспензии почвы в 0,5%-ном растворе карбоксиметилцеллюлозы наносить серийно на поверхность модифицированного пентахлорнитробензольного агара в чашках Петри [724]. Как только излишки воды адсорбируются агаром (обычно через 15—20 мин), на высушенную суспензию наносят три капли лактофуксина. Окрашенные участки покрывают стеклами и просматривают под микроскопом.

Метод почвенных срезов [530, 717] позволяет наряду с определением частоты встречаемости измерять также длину гиф грибов на единицу массы или площади почвы. Суть метода заключается в следующем. Блоки почвы ($1,5 \times 1,0 \times 0,5$ см³) замораживают и высушивают в жидком азоте, пропитывают смолами или канадским бальзамом под давлением 200 мм рт. ст. в течение 30 мин. С помощью микротома делают срезы толщиной 50 мкм, которые просматривают под микроскопом.

Заселенность почвы грибами выражают и общей длиной гиф мицелия в 1 г или 1 см³ почвы [307, 717]. Биомассу рассчитывают из удельного веса мицелия (1,05) и среднего диаметра гиф (5 мкм) сначала на 1 см³ почвы, а затем на 1 га. Биомассу спор определяют, умножая объем спор на удельный вес. Количество спор подсчитывают в 40 квадратах

камеры Горяева в трех повторностях; длину гиф измеряют с помощью окуляр-микрометра. Суммарную длину гиф в 1 г почвы вычисляют по формуле $a = b \cdot 250 \cdot 10^3 x \cdot 10^{-4} \cdot 100/40c$, где b — длина гиф в единицах окуляр-микрометра; x — цена деления окуляр-микрометра в (мкм); c — навеска почвы (г).

Площадь квадрата камеры Горяева равна $1/25$ мм², глубина — 0,1 мм, следовательно, объем одного квадрата равен $1/250$ мм³, или $(1/250) \cdot 10^3$ см³. Объем гиф (см³) рассчитывают по формуле $V = a\pi r^2$. Если диаметр гифы принять в среднем равным 5 мкм, тогда $V = a3,14(2,5)^2 \cdot 10^{-8}$ и масса мицелия на 1 г почвы (g) при удельном весе 1,05 равняется $a \cdot 2,10^{-7} \cdot 1,05$ (г). Масса мицелия на 1 га ($g_{га}$) равняется $g_1 l \cdot 10^8$, где g_1 — масса мицелия в 1 см³, l — глубина горизонта.

Все указанные выше методы учета количественного содержания грибных зародышей в почве путем прямого микроскопирования намного точнее методов высева суспензии почвы на агаризованные питательные среды, однако не позволяют определять видовой состав грибов. Разработаны методы, предусматривающие определение биомассы грибов по содержанию в почве хитина, входящего в состав их клеточной оболочки — аналитический метод, определения живых и мертвых гиф грибов — автордиографический метод, обнаружения в изучаемых субстратах определенных видов грибов — метод флюоресцирующих антител [307]. Так как указанные выше методы имеют крайне ограниченное применение, мы на них не останавливаемся.

ХІХ.2. ВЫДЕЛЕНИЕ МОРСКИХ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ ИЗ КЛАССОВ ASCOMYCETES И DEUTEROMYCETES (FUNGI IMPERFECTI)

ХІХ.2.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Грибы, обитающие в соленых маршах, эстуариях, морях, океанах и в грунтах и илах, а также в озерах с соленой и солоноватой водой, часто обозначаются как морские. Таким образом, термин морские грибы имеет весьма широкий смысл, объединяя большую экологическую группу главным образом микромицетов, включающую значительное количество представителей классов Chytridiomycetes, Hyphochytriomycetes, Oomycetes (ранее объединявшихся в класс Phycomycetes), Ascomycetes, Deuteromycetes и небольшое количество представителей Basidiomycetes. Ряд исследователей предлагают объединять все виды грибов, принадлежащие к разным систематическим группам, но сходные по своей экологии (живущие в морской воде), под названием Thalassiomycetes.

Морские грибы отличаются большим разнообразием систематических и биоэкологических типов, чем и объясняется различие методических подходов к изучению тех или иных групп. Основные систематические группы морских грибов, методы исследования которых существенно различаются, — это низшие грибы: хитридиомицеты и высшие грибы: аскомицеты и дейтеромицеты. Методы сбора, выделения и культивирования низших морских грибов аналогичны методам изучения представителей этих классов, обитающих в пресных водоемах [265, 299]. Методы изучения высших морских грибов существенно

отличаются от таковых, используемых для сбора, выделения и культивирования низших водных грибов из пресноводных и морских местообитаний. Основными естественными субстратами развития морских аскомицетов и дейтеромицетов являются погруженная в воду древесина, листья различных видов деревьев, морские водоросли — макрофиты и высшие растения. Сумчатые и особенно несовершенные грибы обнаруживаются также в толще воды, в морских илах и грунтах; однако, в связи с тем что методы выделения и культивирования этих грибов мало отличаются от методов исследования почвенных грибов, которые детально рассмотрены в разделе III данной книги, здесь они не освещаются.

ХІХ.2.2. СБОР МОРСКИХ СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА ДРЕВЕСИНЕ

Для сбора сапрофитных сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на погруженной в морскую воду древесине, применяют *метод приманок*, предложенный С. Мейерсом [701]. В качестве приманок чаще всего используют блоки или панели из древесины различных пород, сложенные попарно и нанизанные по длине на 6- или 9,5-миллиметровую нейлоновую веревку, верхний конец которой укреплен на поплавке, а нижний заякорен. Такое расположение панелей обеспечивает максимальную площадь поверхности для заселения, развития колонии и спороношения грибов [704]. Хорошие результаты дают также методы, предложенные К. Тубаки [816]. Первый состоит в том, что панели размещают сериями по четыре в одной плоскости, причем расстояние между панелями в серии составляет 2 см. Панели крепят на нержавеющей стальной проволоке. Второй метод заключается в том, что панели сериями по 4—5 размещают друг над другом в специальных цилиндрических мешках из полиэтиленовой сетки, фиксируя их углами в отверстиях сетки. Первый метод применяют в основном в условиях прибрежных районов внутренних морей, где волнение воды не достигает большой силы, второй — на открытых, удаленных от берега участках морей. И в том и в другом случаях серии панелей укрепляют на нейлоновой веревке, верхний конец которой присоединяют к резиновому буйку, а нижний заякоривают. До погружения в воду панели сериями закладывают в бумажные мешки, стерилизуют в автоклаве текучим паром (без повышения давления) в течение 3 ч и вынимают из мешков перед погружением в воду. Срок содержания панелей в воде может быть различным в зависимости от задач исследования — от 2 нед до года и более. Минимальный срок (2 нед) обеспечивает довольно обильное обрастание панелей различными организмами, в том числе и грибами.

Порода древесины, из которой изготовлены блоки или панели, погружаемые в морскую воду для выделения морских сумчатых или несовершенных грибов-сапрофитов, также имеет определенное значение. Для роста плодоношений исследованных сумчатых грибов наиболее пригодной оказалась древесина ясеня белого, бальзы, самшита западноиндийского, тюльпанного дерева, скипидарной сосны и сосны восточной белой, наименее пригодной — древесина черной вишни, кипариса болотного, красного дерева и др. Несовершенные грибы хорошо спороносят на древесине ели, липы американской, березы, кизила, падуба, тикового дерева, тюльпанного дерева, бальзы и совсем не спороносят на древесине кипариса болотного, красного дерева,

дуба красного и др. Общая тенденция, отмеченная у сумчатых и несовершенных морских грибов, заключается в том, что они лучше развиваются на мягкой древесине. Плотная древесина, устойчивая против гнилей, вызываемых наземными грибами, мало пригодна для развития морских сумчатых и несовершенных грибов [636].

После извлечения панелей из морской воды они возможно скорее должны быть доставлены в лабораторию для обработки. В специальных водонепроницаемых полиэтиленовых мешках, куда их помещают сразу же после извлечения из воды, панели можно держать не дольше одного дня [816].

ХІХ.2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МОРСКИХ СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА ДРЕВЕСИНЕ

ХІХ.2.3.1. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ПАНЕЛЕЙ

Выделению чистых культур сумчатых и несовершенных грибов, уже развившихся на панелях или блоках древесины, предшествует обработка панелей. Их поверхность очищают тупым шпательным ножом, освобождают от лишней воды, тщательно промокая их стерильными бумажными тампонами, после чего просматривают под лупой, отмечая местонахождение плодовых тел и спорообразующих колоний стальными булавками. После предварительной обработки некоторые исследователи считают целесообразным перед выделением чистых культур грибов окончательно высушить панели [636] одним из двух способов: панели помещают в предварительно простерилизованный эксикатор на 24 ч, после чего древесину извлекают достаточно сухой для выделения грибов или панели с плодовыми телами аскомицетов и спороносящими колониями несовершенных грибов помещают перед потоком теплого воздуха, создаваемым компрессором. Второй способ более рационален при обработке массового материала. Поток воздуха предварительно пропускают через трубку с CaCl_2 , а затем через трубку со стерильной ватой; панели помещают на расстоянии около 30 см от 13-миллиметрового отверстия трубки; за 2-3 ч их поверхность подсыхает вполне достаточно. При таком подсушивании панелей (а в полевых условиях иногда даже просто перед вентилятором) не наблюдалось случаев загрязнения панелей грибами из воздуха. По мнению ряда исследователей [704, 816], для выделения чистых культур панели после предварительной обработки не следует высушивать, а нужно поместить во влажную камеру на 3—4 нед при 20°C , хотя в каждом конкретном случае срок инкубации в камере определяется исходным состоянием панели и скоростью, с которой на ней развивается основная и сопутствующая микрофлора. Однако такая инкубация, по мнению С. Мейерса и Е. Рейнольдса, позволяет установить полный состав микрофлоры панелей, поскольку сразу же после извлечения из морской воды многие грибы дают на панелях только мицелиальный рост без спороношения, которое образуется лишь при последующей инкубации. В течение инкубационного периода панели несколько раз просматривают под микроскопом или лупой для выявления новых развивающихся грибов.

Т. Джонсон с сотр. [636] предлагает иную конструкцию инкубационной камеры для деревянных панелей ($10 \times 15 \times 2$ см). Ее можно изготовить из двух прямоугольных чашек (21—25 см) из пирексового стекла. Дно одной чашки выстилают 4—6 слоями фильтровальной

бумаги для ликвидации лишней воды из панелей, вторая чашка служит крышкой. Их связывают вместе, обертывают бумагой и стерилизуют. В каждый инкубатор можно поместить две деревянные панели. Края чашек, в которые уже поместили панели, склеивают прозрачной лентой, и ставят камеру в термостат при 20° С. В таких условиях достаточно 7—14 дней для развития интенсивных спороношений сумчатых и несовершенных грибов на поверхности инкубируемых панелей.

Минимальный срок погружения панелей в морскую воду для появления сумчатых и несовершенных грибов — 12 дней летом и 20 — зимой. Но иногда в задачу исследования входит выявление грибов, которые могут развиться на панелях при более длительном погружении в морскую воду, например на 2 мес и более (до 3 лет) [652]. Такие панели очень сильно обрастают различными морскими организмами: водорослями, беспозвоночными; чистка их ножом не всегда удаляет эти образования полностью. В таком случае отбирают наименее обросшие панели, соскребают с них обрастания, тщательно промывают в проточной, отфильтрованной морской воде и нейлоновой нитью связывают такую панель с совершенно чистой панелью, простерилизованной окисью пропилена или автоклавированием. Связанные панели погружают в танк (бак) с проточной морской водой и содержат там 2—3 нед, после чего новую панель используют для выделения сумчатых и несовершенных морских грибов в чистую культуру или же для инкубации перед выделением.

ХІХ.2.3.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГРИБОВ С ПАНЕЛЕЙ ДРЕВЕСИНЫ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Сумчатые и несовершенные морские грибы-сапрофиты выделяют с панелей на питательную среду следующим образом. Под микроскопом на панелях обнаруживают спороносящие колонии гифальных грибов (порядок *Hyphomycetales*), пикниды сферопсидальных грибов (порядок *Sphaeropsidales*) или перитеции сумчатых грибов, из которых выходит споровая масса. Простерилизованной в пламени горелки иглой собирают массу спор или конидий и точками или полосами наносят ее на поверхность агаризованной питательной среды, приготовленной для культивирования морских грибов, развивающихся на древесине [265, 636, 637, 701, 748].

На панелях, высушенных перед выделением развивающихся на них сумчатых и несовершенных грибов, споровая масса, выходящая из плодоношений грибов — пикнид и перитециев, — отсутствует. Выделение этих грибов на питательную среду производят несколько иначе. Пикниду или перитеций гриба протыкают в одном-двух местах стерильной иглой, споры, выходящие из образовавшихся отверстий, собирают и высевают на поверхность агаризованной питательной среды.

Некоторые морские сумчатые и несовершенные грибы-сапрофиты образуют перитеции и пикниды, в значительной степени погруженные в субстрат (древесину). Для выделения этих грибов в чистую культуру из панели стерильным ланцетом вырезают блок древесины не более 4 мм², содержащий единственный перитеций или пикниду гриба. Поверхность блока стерилизуют, погружая его на 1,5 мин в 50%-ный раствор перекиси водорода. Затем блок промывают в пяти сменах стерильной морской воды, помещают на сухое стерильное предметное стекло и тщательно дробят на мелкие кусочки стерильными препаровальными иглами, освобождая плодоношение гриба от окру-

жающей древесины, после чего плодовое тело протыкают стерильной иглой и выходящую массу спор высевают на агаризованную среду.

Метод погружения блоков и панелей древесины различных пород в качестве приманки для обнаружения морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов с последующим выделением этих грибов в чистую культуру на различных питательных средах является весьма распространенным в настоящее время и применяется многими исследователями, изучающими микофлору океанов, морей и эстуариев.

ХІХ.2.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА ГНИЮЩИХ ЛИСТЬЯХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

В качестве приманок для обнаружения встречающихся в морской воде сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов кроме панелей и блоков древесины используют также листья различных древесных пород, в частности лавровишни и земляничного дерева. Листья отмыывают в стерильной воде, заворачивают в алюминиевую фольгу и помещают в стерильные полиэтиленовые бутылки с продольными или округлыми отверстиями в стенках. Бутылки погружают в открытом море или в зоне прилива —отлива на глубину около 2 м, закрепляя их на нейлоновой веревке, верхний конец которой присоединен к буйку, а нижний заякорен. Сосуды с листьями выдерживают в морской воде 1—4 нед. После извлечения листья переносят в стерильную посуду и доставляют в лабораторию, где их в течение 3 дней инкубируют в чашках Петри, наполненных стерильной морской водой. Через 3 дня на листьях появляются плодоношения и колонии сумчатых и несовершенных грибов, из которых производят выделение на искусственные питательные среды способами, аналогичными выделению грибов с панелей древесины [493].

ХІХ.2.5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЯХ-МАКРОФИТАХ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

Сумчатые и несовершенные грибы-сапрофиты встречаются в морях и океанах не только на таких специфических субстратах, как погруженная древесина и листья древесных пород, но также на поверхности водорослей-макрофитов и высших растений. Некоторые представители последней группы не являются истинными сапрофитами, а скорее могут быть отнесены к факультативным паразитам, т. е. обычно они живут сапрофитно, но нередко при особых условиях переходят к паразитизму. Согласно данным Яна Кольмейера [656], эти грибы образуют с водорослью и высшим растением, на которых они обитают, своеобразную симбиотическую ассоциацию.

Для сбора и выделения сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на поверхности талломов морских водорослей-макрофитов и стеблей и листьев высших морских растений, применяют метод непосредственного сбора водорослей *Sargassum*, *Ascophyllum*, *Fucus*, *Laminaria*, *Lithophyllum*, *Cystoseira*, *Epilithon*, *Ballia* и многих других, высших травянистых растений *Zostera*, *Thalassia*, *Juncus*, *Posidonia*, *Spartina* и других, корней, ризофоров, пневматофоров древесных

растений мангровых зарослей: *Rhizophora*, *Avicennia*, *Mangifera* и других растений мангров, нижняя часть которых постоянно погружена в морскую воду.

Наиболее разработаны в настоящее время методы исследования сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся на водорослях. Эти грибы многие исследователи выделяют в самостоятельную так называемую водорослевую группу (*algicolous* или *rhysophilous group* [654]) в отличие от грибов, развивающихся на погруженной древесине (*lignicolous group* [817]).

ХІХ.2.5.1. СБОР ВОДОРΟΣЛЕЙ-МАКРОФИТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МОРСКИХ СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ

Для сбора водорослей, которые являются субстратом грибов водорослевой группы, используют драги, а на небольших глубинах (до 10 м) их достают путем непосредственного погружения с трубкой и маской для подводного плавания [8]. Во всех случаях полученный материал микроскопируют для выявления представителей микологической флоры. Для этой цели наиболее пригоден следующий способ. Собранные талломы водорослей, содержащие плодоношения грибов, замораживают и хранят в холодильнике необходимое время. Плодовые тела, а также колонии грибов не претерпевают значительных морфологических изменений при замораживании. Срезы плодовых тел сумчатых и несовершенных грибов производят с помощью микротомы при 15° С. Для выявления слизистых отростков у аскоспор и исследования структуры сумок материал окрашивают кислым фуксином, анилиновым голубым, хлопчатобумажным синим, гематоксилином или виоламином. Вполне пригодны для микроскопического исследования также талломы водорослей с плодовыми телами грибов, зафиксированные в формалине, и даже гербарные образцы этих талломов.

ХІХ.2.5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЯХ-МАКРОФИТАХ

Известно несколько способов обработки материала для выделения чистых культур сумчатых и несовершенных морских грибов, развивающихся на водорослях.

1. Кусочки таллома водорослей инкубируют в чашках Петри на стерильной фильтровальной бумаге при комнатной температуре [817]. Через 3 нед на водоросли и окружающей стерильной фильтровальной бумаге появляются плодоношения грибов.

2. Кусочки водорослевых талломов раскладывают на чашки Петри, дно которых едва прикрыто слоем стерильной морской воды, так что водоросли только частично погружены в нее. Водоросли инкубируют при комнатной температуре в течение нескольких недель [653]. Через 2 нед на кусочках талломов появляются плодоношения грибов.

3. Кусочки талломов водорослей помещают на поверхность различных агаризованных питательных сред в чашки Петри и инкубируют при температуре 5—20° С [8]. В зависимости от температуры, при которой производилась инкубация, через определенное время (от суток до нескольких дней) на поверхности сред появляются колонии грибов, иногда содержащие плодоношения. Во всех случаях полученные исходные культуры грибов вполне пригодны для выделения из них чистых культур, которое осуществляют общепринятыми методами.

ХІХ.2.5.3. СБОР ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА МОРСКИХ СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ

Травянистые морские растения собирают драгами или же путем непосредственного погружения. Полученный материал сразу же микроскопируют для выявления плодовых тел и спороносящих колоний сумчатых и несовершенных морских грибов. Большинство грибов этой группы достаточно хорошо обнаруживается при микроскопировании растительных субстратов. Особенно это относится к сумчатым и несовершенным морским грибам-сапрофитам, развивающимся на погруженных в воду частях мангровых деревьев *Rhizophora* и *Avicennia*. Их корни и пневматофоры, постоянно находящиеся в морской воде, выполняют роль своеобразных приманок для целого ряда сумчатых и несовершенных грибов [655].

Сразу же после извлечения из воды травянистые растения подвергают микроскопическому исследованию. В результате прямого микроскопирования на некоторых из них также обнаруживают представителей сумчатых и несовершенных грибов [702]. Для получения более полного представления о видовом составе грибов части высших растений нередко инкубируют методом Кольмейера [653], т. е. помещают их в чашки Петри с незначительным количеством стерильной морской воды и инкубируют при комнатной температуре в течение нескольких недель.

ХІХ.2.6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОРСКИХ СУМЧАТЫХ И НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ

Особенность сумчатых и несовершенных морских грибов-сапрофитов, так же как и хитридиомикетов, состоит в том, что большинство морских видов этих систематических групп в естественной среде обитания приспособилось к существованию при высоких значениях солености воды (до 37‰, иногда и более).

При составлении питательных сред для выделения и культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов в первую очередь учитывают адаптацию представителей морской микрофлоры к высокой солености воды. Поэтому в состав сред в обязательном порядке входит минеральная основа, эквивалентная по компонентам морской воде (г): 2,5NaCl; 0,5MgSO₄ · 7H₂O; 0,1KCl; 0,01KH₂PO₄; 0,02CaCO₃. В большинстве случаев среды для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов готовят на естественной морской воде. Наряду с универсальными питательными средами, которые могут быть использованы для культивирования почти всех сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, разработаны специальные селективные и дифференциальные среды для исследования питания отдельных представителей этих групп грибов.

ХІХ.2.6.1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И МАССОВОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОРСКИХ ГРИБОВ

Питательные среды для культивирования морских аскомицетов и дейтеромицетов подбирают в зависимости от целей и задач, которые ставит перед собой специалист-миколог. Среда неопределенного химического состава подходит для выделения, массового выращивания и хранения чистых культур морских аскомицетов и несовершенных грибов, а

также для более специальных задач — получения плодоношений, изучения накопления биомассы, предварительного исследования потребностей грибов в различных источниках питания. Более глубокое исследование физиологии этих групп грибов требует применения синтетических сред определенного химического состава (см. приложение 9).

ХІХ.3. ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Экспериментальное изучение высших базидиальных грибов стало возможным благодаря разработке доступных методов получения чистых культур этих грибов. Ниже изложены главным образом методы выделения чистых культур высших базидиомицетов и некоторые методы исследования и культивирования, специфичные для данной группы грибов.

ХІХ.3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Чистые культуры базидиомицетов могут быть выделены из плодовых тел, при проращивании базидиоспор, из корней микоризообразующих растений или же из почвы, древесины и других субстратов, являющихся средой обитания этих грибов. Наиболее простой и удобный способ получения желаемых культур высших базидиальных грибов — выделение культур из плодовых тел или базидиоспор, если они легко прорастают. Выделение культур из субстрата или микоризных окончаний корней, применяющееся для специальных исследований, мало эффективно, а идентификация полученных культур представляет большие трудности.

ХІХ.3.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ИЗ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ

При выращивании в чистой культуре мицелия высших базидиальных грибов обычно преследуется цель получения штаммов, характеризующихся быстрым и обильным ростом мицелия с высоким содержанием белка или же образующих биологически активные вещества независимо от качества плодоношения этих штаммов. В этом случае поиск продуцентов, как правило, ведется в природе. Если же целью выращивания является получение регенеративного (посевого) мицелия для производства плодовых тел, необходимо проводить выделение чистой мицелиальной культуры из плодовых тел отселекционированных культивируемых рас, выращиваемых в теплицах.

Сбор плодовых тел в природе лучше осуществлять в период их массового появления, в сухую погоду. Для выделения культуры следует выбирать молодые, неповрежденные плодовые тела, так как они меньше инфицированы микроорганизмами. Выделение можно проводить в день сбора или хранить плодовые тела в течение 2—3 дней в холодильнике в полиэтиленовых мешочках.

Обработка плодовых тел. Перед выделением плодовое тело следует осторожно очистить от прилипших растительных остатков, соскоблить почву с ножки, промыть в проточной и стерильной воде и положить на фильтровальную бумагу, чтобы оно обсохло. Промывать плодовые тела нужно быстро, чтобы они не пропитались водой. Плодовое тело можно также быстро обжечь над пламенем горелки.

Выделение инокулюма. Предварительно обработанное плодовое тело разламывают, и кусочек «ткани» из середины стерильным скальпелем, ланцетом или копьем переносят на питательную среду. Ни в коем случае не следует обжигать инокулюм в пламени горелки. Выделение производят из разных частей плодового тела: шляпки, ножки, места перехода шляпки в ножку, гимениального слоя. При выборе участка ткани исходят из размеров и строения плодового тела. Обычно выбирают самую толстую часть плодового тела. Для болетальных грибов особенно рекомендуется основание ножки. В некоторых случаях (например, у белого гриба) вокруг кусочков плодового тела из основания ножки появляются зачатки плодовых тел. У грибов с мелкими и тонкими плодовыми телами культуру можно выделить путем посева мелко нарезанных ножек или пластинок. Если плодовое тело молодое, шляпка не развернута или затянута снизу покрывалом, а трубочки гименофора еще закрыты (у болетальных грибов), выделение лучше проводить из гимениального слоя. Целесообразнее отбирать внутренние стерильные части грибной «ткани». Для успешного выделения следует использовать кусочки гриба диаметром 0,5—1,5 см.

Части плодового тела помещают на питательную среду в чашки Петри, чашечки для тканевых культур или пробирки. Расход среды при посеве на чашки для тканевых культур (диаметр 5—7 см) незначителен. В каждую чашку помещают только один кусочек, что важно для предотвращения загрязнения. Кусочки плодового тела помещают сверху на агар или частично погружают в агаризованную среду. Инокулюм плохо выделяющихся видов рекомендуется на несколько дней поместить в чашку Петри на смоченную стерильной водой фильтровальную бумагу. Когда инокулюм покроется растущим мицелием, его переносят на питательную среду. Таким же образом выделяют и дереворазрушающие грибы. Во влажную камеру помещают тщательно отмытые, разрезанные плодовые тела или же кусочки древесины, пронизанные мицелием гриба. Чашки с инокулюмом помещают в термостат при температуре 20—25° С. При более высоких температурах (26—28° С и выше) скорость выделения может замедляться. В жаркое время года чашки с инокулюмом на 1—2 дня помещают в холодильник при 5—10° С, а затем переносят в термостат. Желательно, чтобы относительная влажность воздуха была не ниже 80%, для чего в термостат помещают сосуд с водой.

Молодой растущий мицелий появляется на кусочках плодовых тел у разных видов в разные сроки: от нескольких дней до 3—4 нед. В последнем случае кусочек плодового тела для предохранения от высыхания лучше помещать сразу в пробирку или же заклеивать чашки лейкопластырем.

Выделение культур производят обычно на твердую среду: сусло-агар, солодовый агар, картофельно-глюкозный агар, мальц-агар и т. д. Если выделение идет плохо и мицелий не образует колонию вокруг инокулированной ткани, в состав среды следует добавить дрожжевой автолизат, отвар коры, хвои или листьев различных высших растений (обычно 0,1—5% по объему), экстракт плодовых тел грибов. Грибные экстракты готовят следующим образом: плодовые тела грибов измельчают, заливают холодной водой так, чтобы они были полностью покрыты, и сутки выдерживают на холоду. После этого жидкость отфильтровывают, трижды стерилизуют текучим паром и добавляют к среде в количестве 4—5%.

В чашке Петри вместе с колониями базидиальных грибов могут расти колонии плесневых грибов, дрожжей, бактерий, что обычно

легко заметить. В таких случаях предполагаемые колонии базидиомицетов нужно последовательно пересевать с обязательным последующим микроскопическим контролем и избавиться от посторонней флоры с помощью обычных методов микробиологической техники. Для подавления роста бактерий, загрязняющих грибные культуры, при выделении рекомендуется использовать подкисленный агар (рН 4,5—5,0), антибиотики, лучше их комбинации (200 ед. пенициллина, 100 ед. стрептомицина в 1 мл среды и др.). Для ингибирования роста плесневых грибов в среду добавляют 5 мг/л фундазола или бенонила. Чистые культуры базидиомицетов можно выделять также на жидких средах с набором витаминов и слабой концентрацией питательных веществ, на раствор мальц-экстракта (0,8%-ный). Жидкие среды эффективны в тех случаях, когда на агаризованную среду культуру выделить не удастся [708].

Легко выделяется культура таких грибов, как *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer, *Armillariella mellea* (Vahl.) Fr., *Coprinus comatus* (Fr.) S. F. Gray, *Lepista nuda* (Fr.) W. L. Smith, *Clitocybe nebularis* (Fr.) Quél., *Macrolepiota procera* (Fr.) Sing., *Pholiota squarrosa* (Fr.) Quél., многих афиллофоральных и гастеромицетов. Кусочки плодовых тел таких грибов, помещенные на питательную среду или во влажную камеру, быстро покрываются растущим мицелием; бактериальное загрязнение незначительно. Кусочки плодовых тел *Cantharellus cibarius* Fr., видов рода *Gomphidius* обычно обильно зарастают бактериями.

Некоторые грибы, особенно представители родов *Lactarius* и *Russula*, с трудом выделяются в культуру, несмотря на отсутствие бактериального загрязнения. О. Модесс [708] и П. Микола [705] приводят списки грибов, которые не растут в культуре. Однако все дело, очевидно, в умелом подборе оптимальных условий для их роста. Трудно выделяются и скудно растут на обычных средах многие виды родов *Amanita*, *Cortinarius*, *Clitocybe vibescina*, *Pluteus stricapillus* (Sacc.) Sing., *Tricholoma vaccinum* (Pers. ex Fr.) Kumm., *Tricholomopsis platyphylla* и др. Выделяют группу так называемых приспособительных видов [766], у которых наблюдается медленный рост колонии вокруг инокулюма. К ним относятся *Agaricus silvaticus* Sacc., *Calocybe gambosa* (Fr.) Donk, *Tricholoma georgii* Fr., *Mycena polygramma* (Bull. ex Fr.) S. F. Gray и др.

Следует иметь в виду, что разные штаммы одного и того же вида могут значительно отличаться скоростью роста и требованиями к питательной среде. Культуральные признаки изолятов, выделенных в разное время года или из плодовых тел грибов неодинакового возраста, часто различаются. Штаммы, выделенные из разных экологических и географических зон, также могут отличаться интенсивностью роста в культуре.

ХІХ.3.1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ИЗ БАЗИДИОСПОР

В тех случаях, когда размеры, строение или консистенция плодовых тел не позволяют выделить из них мицелиальную культуру, ее получают из базидиоспор. Последние используют также для получения чистых культур при проведении специальных биологических, в частности генетических, исследований. Базидиоспоры большинства подстилочных сапрофитов, копрофильных, лигнофильных и других немикоризных грибов прорастают обычно легко. Проращивание же базидиоспор многих микоризообразователей представляет значительные трудности. Удалось прорастить споры микоризообразующих гри-

бов родов *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hydnum*, *Paxillus*, *Russula*, *Tricholoma* и некоторых др. [697]. Посев базидиоспор производят или непосредственно после сбора плодовых тел, или же после хранения. Плодовые тела гастеромицетов перед посевом или помещением на хранение следует высушить в течение нескольких дней при комнатной температуре. Недозрелые плодовые тела оставляют до созревания, о чем судят по побурению глебы. Плодовые тела сохраняют неразрезанными.

Оптимальные сроки хранения спорового материала различны не только у разных видов, но и в пределах вида. У видов рода *Boletus* споры прорастают как на 2—4-е сут после сбора, так и после хранения в течение года при низких температурах; у *Calvatia gigantea* Fr. оптимальный процент прорастания спор отмечен после 8—14 мес. хранения при температуре от -18 до $+12^{\circ}$ С. Споры *Schizophyllum commune* Fr. прорастали при хранении в вакууме более чем через 50 лет [788].

Однородную водную суспензию базидиоспор определенной концентрации высевают в чашки Петри на агаризованную среду, лучше глубинно. Успех прорастания зависит от подбора концентрации спор, индивидуальной для каждого вида и иногда для каждого плодового тела. У *Calvatia gigantea* оптимальная концентрация базидиоспор для разных плодовых тел составляет 1—5 млн. спор на чашку. Базидиоспоры грибов рода *Мусена* прорастают хорошо при концентрации в чашке от нескольких сотен до нескольких тысяч. Споры *Agaricus campestris* лучше прорастают в массе.

Посев базидиоспор можно производить и непосредственно из плодовых тел методом Фриза [589]. Плодовые тела для этой цели собирают в день или за день до опыта; в последнем случае их хранят в холодильнике при температуре 3° С. Шляпку гриба вазелином прикрепляют к внутренней стороне крышки пустой стерильной чашки Петри. Агаровую среду разливают в другие чашки, крышки которых поочередно на 5 мин заменяют крышкой с плодовым телом. За это время в чашку успевают попасть от нескольких сотен до нескольких тысяч базидиоспор. Если плодовые тела малы, то можно прикреплять их к крышке по несколько штук. В этом случае для получения однородного спорового материала желательно использовать плодовые тела грибов, произрастающих в одном месте.

По методу Ключника [213] для прорастания базидиоспор в условиях, близких к природным, свежесобранные базидиоспоры помещают между предметными стеклами и закапывают в почву на глубину около 5 см. Представители разных родов и видов грибов прорастают в разные сроки. Прорастание базидиоспор начинается ростом первичного мицелия, состоящего из тонких, тонкостенных, многоклеточных гиф. Заметные колонии появляются обычно в течение 30 дней, но у некоторых видов от посева спор на питательную среду до образования колоний проходит 2—3 мес; 99—100% спор *Мусена rosea* прорастают уже через 12 ч после посева; колонии из базидиоспор *Lycoperdon*, *Calvatia gigantea* появляются приблизительно через 30 дней. Процент всхожести многих микоризообразующих грибов очень низок (0,001—1%).

Для проращивания спор используют 2,5%-ный водный агар, сусло-агар, мальц-агар, питательную кислую желатину, синтетические среды с тиаминном, различные природные субстраты, такие, как экстракты плодовых тел грибов, дрожжей, листьев, хвои, почвы, навоза и т. д. Споры многих гименомицетов прорастают в присутствии экстракта пищеварительного тракта слизняка. Выбор подобных стимуляторов следует основывать на изучении экологии гриба.

Стимулирующее влияние на прорастание базидиоспор оказывают живые дрожжи, в частности *Togula sanguinea*. Инокуляцию дрожжевой культурой осуществляют через 24 ч после посева спор гриба в чашки Петри. Прорастание базидиоспор некоторых видов сыроежек происходит только в присутствии живых корней высших растений, причем не только древесных, но и томата. Наличие живых корней стимулирует прорастание базидиоспор *Suillus luteus*, *S. piperatus* (Fr.) Kuntz.

При составлении синтетических сред для проращивания базидиоспор следует иметь в виду, что высокое содержание питательных компонентов в среде может тормозить прорастание. Установлено, что для спор многих базидиомицетов токсичны ионы аммония. Так, прорастание спор видов рода *Мусепа* подавляется при содержании в среде 0,1—0,5% виннокислого аммония. Базидиоспоры могут прорасти и просто в воде. Однако не подвергавшаяся стерилизации вода из водоемов и морская вода ингибируют прорастание. Во избежание бактериального загрязнения в питательную среду так же, как при выделении культур из плодовых тел, добавляют антибиотики.

Оптимальная температура прорастания базидиоспор значительно варьирует у разных видов и штаммов в пределах вида. Температурный оптимум может изменяться в зависимости от состава питательной среды и обычно находится в пределах 15—30° С. Для успешного прорастания многие базидиальные грибы, такие, как *Paxillus involutus* Fr. ex Batsch., *Tricholoma equestre* (Fr. ex Linn.) Quel., некоторые виды родов *Flammulina*, *Marasmius*, *Agaricus*, *Lactarius* и другие, требуют пониженных температур, как это имеет место в природе. После охлаждения споры должны быть перенесены в оптимальные для прорастания температурные условия. Базидиоспоры ряда копрофильных грибов, которые перед прорастанием в природных условиях проходят через пищеварительный тракт, можно стимулировать предварительным нагреванием до температуры 37—40° С.

Свет необходим для прорастания преимущественно тех грибов, на которые оказывает стимулирующее действие предварительное охлаждение. Пока еще накоплено очень мало экспериментальных данных о влиянии светового спектра и количества света на прорастание базидиоспор. Здесь важно правильное сочетание температурного и светового режимов.

Для прорастания базидиоспор необходимо поддерживать относительную влажность воздуха не ниже 80%. Высокую влажность в чашках Петри сохраняют, помещая их в эксикатор или заклеивая лейкопластырем, изоляционной лентой, помещая сосуд с водой в термостат.

Для преодоления периода покоя базидиоспор применяют: предварительное охлаждение или нагревание, чередование охлаждения и нагревания, чередование увлажнения и высыхания, физическое воздействие на споровую оболочку путем растирания базидиоспор с кварцевым песком, встряхивание суспензии спор с мелкими частицами стекла и т. д. Активирование прорастания достигается также обработкой базидиоспор химическими веществами. Из неорганических веществ используют серную, соляную, фосфорную и азотную кислоты, азотнокислый кальций, аммонийные соединения, из органических веществ — этиленовый и другие спирты, ацетон, хлороформ, бензин, альдегиды. К активаторам прорастания относятся органические кислоты — оксалаты, ацетаты, цитраты, аминокислоты, α -аланин, α -пролин, триптофан; мощными стимуляторами прорастания базидиоспор являются поверхностно-активные вещества. Органические вещества, такие, как

алифатические спирты и эфиры, активируют прорастание спор в 100—1000 раз более высокой концентрации, чем растворы гетероциклических соединений (например, фурфурол — 1 : 1 000 000).

ХІХ.3.1.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В КУЛЬТУРЕ

При культивировании мицелия съедобных грибов на жидких средах особо важное значение приобретает идентификация культур базидиомицетов и контроль за чистотой культуры с момента выделения до получения готового продукта. В первые годы культивирования мицелия на жидких средах часто вместо высшего базидиального гриба в промышленных масштабах культивировали несовершенный или низший гриб. Такова печальная судьба штамма *Agaricus campestris*, впоследствии идентифицированного как *Beauveria* [709] и фигурирующего в известных работах Г. Хумфельда, Т. Ф. Сугихары, Ф. Ройссера, Д. Ф. Т. Спенсера, А. М. Мустафы [625—627, 714, 753, 784]. Подобные ошибки можно объяснить недооценкой необходимости изучения культивируемого гриба в онтогенезе, точного знания его морфологии, четкой идентификации типов бесполого и вегетативного спороношений.

Идентификация мицелиальных культур. При выделении чистой культуры из плодовых тел или базидиоспор прежде всего необходимо с помощью определителя установить вид гриба исходя из морфологических признаков плодовых тел, собранных для выделения. После выделения мицелиальной культуры необходимо убедиться в том, что это действительно культура предполагаемого гриба, а также при дальнейшем культивировании постоянно осуществлять контроль за ее чистотой по культуральным и морфологическим признакам. Если культура получена путем проращивания базидиоспор, то вероятность ошибки меньше, так как прорастание можно наблюдать непосредственно из базидиоспор, откуда развивается первичный гаплоидный мицелий, состоящий из тонких, тонкостенных, многоклеточных гиф. Возникновение вторичного, диплоидного мицелия у гетероталлических видов происходит при встрече вершинных клеток первичных мицелиев, развившихся из разных спор, или же путем образования анастомозов между ветвями первичного мицелия. У гомоталлических видов диплоидизация происходит обычно в результате образования анастомозов между ветвями одного и того же мицелия.

Мицелиальная культура, полученная из плодового тела, состоит из диплоидного мицелия, для которого у многих высших базидиомицетов характерны так называемые пряжки (рис. 131,а). Наличие пряжек в мицелии служит несомненным доказательством принадлежности гриба к высшим базидиомицетам. Однако пряжки могут и отсутствовать у некоторых представителей этой систематической группы. Пряжки обнаружены на мицелии видов, относящихся к родам *Clitocybe*, *Collybia*, *Coprinus*, *Lepista*, *Nematoloma*, *Pleurotus*, *Marasmius*, *Oudemansiella*, *Pholiota*, *Flammulina*, *Schizophyllum*, *Kuehneromyces*, *Phallus*, и у большинства афиллофоральных грибов. Пряжки отсутствуют у *Boletus edulis* Fr., *Armillariella mellea*, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Bond. et Sing., *Fomitopsis annosa* (Fr.) Karst., *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. и других и у многих видов родов *Agaricus*, *Amanita*. У некоторых видов пряжки многочисленны, у других — единичны. За появлением пряжек нужно следить уже на самых ранних стадиях выделения в культуру, когда на инокулюме и вокруг него на агаре начинает расти молодой мицелий, так как в более старых культурах пряжек

иногда обнаружить не удастся. В других случаях пряжки появляются лишь после нескольких пересевов гриба на разные среды. Кроме пряжек имеется целый ряд микроскопических признаков, характерных для высших базидиомицетов, но встречающихся и у грибов из других систематических групп: анастомозы, медальоны, вздутия, тяжи, ризоморфы, инкрустированные гифы и т. п. При идентификации культур эти признаки должны приниматься во внимание в совокупности со всеми морфолого-культуральными особенностями данного вида в условиях искусственной культуры.

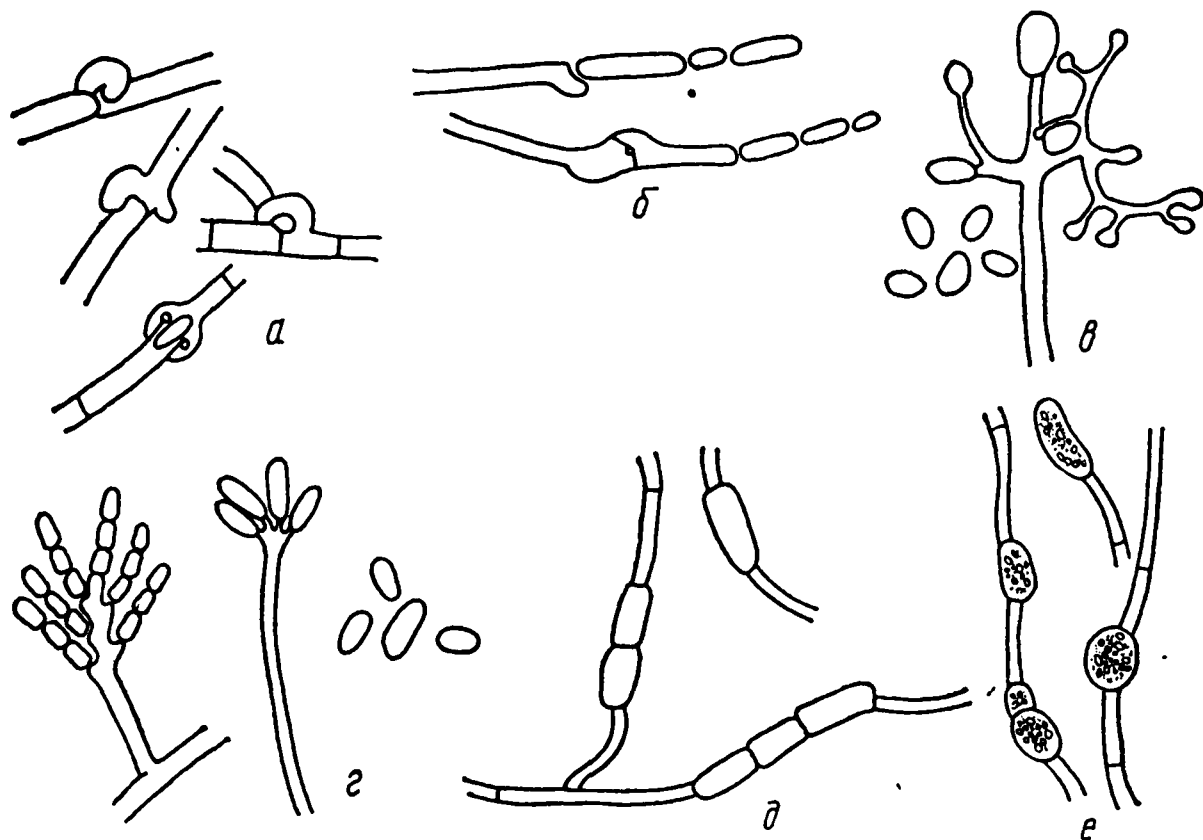


Рис. 131. Морфологические особенности культурального мицелия высших базидиомицетов:

а — пряжки, характерные для диплоидного мицелия; *б* — оидии *Gloeophyllum seriarium* (Fr.) Bond. et Sing.; *в* — конидиальное спороношение *Laetiporus sulphureus* (Fr.) Bond. et Sing.; *г* — конидиальное спороношение *Pholiota adiposa* (Fr.) Kumm.; *д* — хламидоспоры *Agaricus silvaticus* Secr.; *е* — хламидоспоры *Calvatia excipuliformis* (Pers.) Perd.

Многие высшие базидиомицеты в условиях искусственной культуры образуют бесполое спороношение — артроконидии, бластоконидии, хламидоспоры (например, *Flammulina velutipes*, *Cortinarius delibutus* Fr., *Pholiota adiposa*, *Ph. aurivella* (Fr.) Quél., *Laetiporus sulphureus*, *Panus tigrinus*). Необходимо точно установить тип конидиального спороношения, если таковое имеется, и сравнить с описанным в литературе для данного вида гриба. Простое указание на то, что гриб в культуре образует споры или, как их в ряде работ неопределенно именуют «вторичные» или «секундарные» («secondary») споры, может привести к серьезным ошибкам. При культивировании на агаровых средах конидиальные спороношения обычно имеют выраженную видовую специфичность (рис. 131, *б*, *в*). Хламидоспоры же, бластоконидии, как правило, сходны у многих видов и родов (рис. 131, *г*, *д*, *е*). Если в литературе отсутствует описание морфологических признаков выделяемого в культуру гриба, то необходимо провести неоднократные выделения из плодовых тел, собранных в разных местобитаниях, и убедиться в идентичности полученных изолятов.

Важным признаком вида являются скорость и характер роста на разных средах, окраска мицелия и субстрата, наличие тяжей, ризо-

морф, наличие экссудата, запах. В погруженной культуре мицелий высших базидиомицетов, как и других мицелиальных грибов, растет в виде мицелиальных клубочков или агломератов различных размеров; в культуральной жидкости всегда наблюдается также значительное количество обломков мицелиальных нитей. В тех случаях, когда мы говорим о дисперсном росте, преобладают очень мелкие мицелиальные шарики или гифы разной длины, часто трудно различимые невооруженным глазом. Размеры мицелиальных шариков не являются постоянными для каждого вида гриба; они могут значительно изменяться в зависимости от количества и дисперсности посевного мицелия, аэрации, состава питательной среды и т. д.

При выращивании съедобных грибов на жидких средах постоянно следует осуществлять также микробиологический контроль чистоты культуры. Сначала устанавливают чистоту и морфологическую однородность посевного материала. Чтобы убедиться в том, что посевной материал не загрязнен бактериями, его высевают на бульон, агар Хоттингера или МПБ с 0,5% глюкозы и МПА. Инкубацию проводят при температуре 37° С в течение 2—3 сут. Для выявления возможного загрязнения дрожжами или другими грибами производят посев гриба на сусловый агар или среду Чапека с последующей инкубацией при температуре 25 и 37° С в течение не менее 5 сут. В конце каждой ферментации необходимо высеять выросшую в культиваторе мицелиальную культуру на агаровую среду и сравнить ее морфолого-культуральные признаки и микроскопическое строение с исходной культурой. В ряде случаев в процессе погруженного культивирования могут произойти засорение и вытеснение мицелиальной культуры базидиального гриба другим более быстрорастущим мицелиальным грибом из несовершенных, фикомицетов и др.

В литературе имеется очень мало данных о морфологии базидиомицетов, растущих в погруженной культуре. Конидии отмечены у *Pholiota adiposa*, *Ph. aurivella*, *Clitocybe nebularis*, *Russula decolorans*, *Lycoperdon pyriforme*, *Laetiporus sulphureus*, *Sparassis crispa*. Хламидоспоры — у видов рода *Agaricus*, *Coprinus ephemerus*, *Lepista nuda*, *Calvatia caelata*, *C. excipuliformis*, *Fistulina hepatica*, *Laetiporus sulphureus* [82]. В большинстве случаев такие же образования отмечены у этих грибов при росте на агаровых средах. Как правило, грибы, образующие при росте на агаризованных средах пряжки, сохраняют эту способность и в погруженной культуре при благоприятных условиях культивирования.

Идентификация вегетативного мицелия без пряжек. Наиболее сложной задачей представляется идентификация неспорносящего вегетативного мицелия без пряжек. В таком случае необходимо провести дополнительные исследования с целью получения плодоношений. При этом должны быть использованы как методы, индуцирующие спороношения у несовершенных грибов и фикомицетов [59, 454], так и методы, индуцирующие образование плодоношений у базидиомицетов, о чем будет сказано ниже. Если у сомнительной культуры не удастся получить плодоношений или характерных бесполох спороношений, то принадлежность к базидиомицетам может быть достоверно установлена с помощью электронно-микроскопического исследования по строению межклеточной перегородки, так называемой долипоры [711].

В настоящее время идентификация культур высших базидиомицетов представляет значительные трудности из-за отсутствия соответствующих пособий. В работе М. Ноблз [719] дан политомический ключ для определения 149 видов дереворазрушающих грибов. Описание

культур отдельных видов агарикальных и болетальных грибов приведено в работе В. Я. Частухина и М. А. Николаевской [466], характеристика культуральных признаков 57 видов грибов семейства Agaricaceae — в работе М. Семерджиевой [766]. В работе Дж. Столперса (Stalpers J. A.— *Studies in Mycology*, 1978, N 16, p. 248) приведены данные изучения 1500 штаммов деревообитающих базидиомицетов и дан ключ к определению культур 550 видов.

Получение в культуре плодовых тел высших базидиомицетов. Получение в культуре нормально развитых плодовых тел — наиболее надежный способ определения культуры. Целый ряд видов легко образуют плодовые тела в обычных лабораторных условиях, например *Flammulina velutipes*, *Panus tigrinus*, *Nematoloma sublateralitium* (Fr.) Karst., *Schizophyllum commune*, виды родов *Pholiota*, *Pleurotus*, *Coprinus* и др. В условиях культуры получены плодовые тела многих видов родов *Fomes*, *Phellinus*, *Coriolus*, *Coriolellus*, *Coriolopsis*, *Copriophora*, *Ganoderma*, *Galerina*, *Lenzites* и др. Попытки получить в культуре плодовые тела большинства микоризных грибов оказались неудачными. Из болетальных грибов плодовые тела в условиях культуры образуют виды родов *Phlebopus* и *Xerocomus*, зачатки плодовых тел наблюдаются у грибов родов *Boletus*, *Leccinum*, *Pulveroboletus*, из гастеромицетов — *Lycoperdon pusillus* Pers., *Cyathus stercoreus* (Schw.) De Toni.

Наблюдения за плодоношением в культуре легкоплодоносящих базидиальных грибов, главным образом упоминавшихся выше, позволяют перечислить факторы, влияющие на образование плодовых тел. К ним относятся прежде всего свет, состав питательной среды, температура, влажность, аэрация. Ряд факторов внешней среды, а также генетическое и физиологическое состояние грибов, определяющие плодоношение в культуре, остаются мало изученными.

Выделяют четыре стадии онтогенетического развития высших базидиомицетов [797]: вегетативного роста, зачатков, развития плодовых тел, образования базидиоспор. Каждая из этих стадий характеризуется определенным физиологическим состоянием гриба, своеобразными метаболическими процессами, требованиями к условиям среды. Условия, благоприятные для плодоношения, могут не совпадать с оптимальными условиями для роста мицелия. Для получения плодовых тел хорошо плодоносящих видов, таких, как *Flammulina velutipes*, *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus*, обычно используют тот же субстрат, на котором сохраняется в лаборатории культура гриба — сусло-агар, мальц-агар и т. п. В качестве питательных субстратов для получения плодовых тел многих видов рекомендуется использовать пористые субстраты: смоченные разбавленным суслом или минеральной средой древесные опилки и древесную муку, мелко нарезанные веточки и хвою, высушенный ржаной хлеб с водой, кашу из хлебных крошек, размягченную в 40%-ном растворе лимонной кислоты. К этим субстратам можно также добавлять витамины, мальц-экстракт, дрожжевой экстракт, картофельный крахмал, муку различных зерновых культур, казеиновый гидролизат. Для дереворазрушающих грибов применяют среду Бэдкока [500, 501], состоящую из древесной муки с добавкой костной муки, картофельного крахмала, сахара и древесной золы. Основные питательные среды, применяемые для получения плодоношений (высших базидиальных грибов), приведены в приложении 10.

Богатый питательными веществами субстрат, способствующий хорошему вегетативному росту мицелия, не всегда оптимален для об-

разования плодовых тел. В некоторых случаях появление плодоношений стимулирует перенос гриба на бедную среду. Оптимальные для плодоношения интервалы значений pH среды обычно меньше, чем благоприятные для мицелиального роста гриба. Для плодоношения *Flammulina velutipes* оптимальны pH 5—6, *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst., *Lentinus edodes*, *Hericiium erinaceum* (Fr.) Pers.— около 4, *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc.— 5—6. Появление плодовых тел можно стимулировать, помещая на поверхность колонии кусочек плодового тела гриба, даже другого вида. Плодовое тело в таком случае образуется на некотором расстоянии от стимулирующего кусочка. Получить плодоношение можно как на твердых, так и на жидких средах, однако на жидкой среде плодовые тела обычно развиваются медленнее.

Время появления плодовых тел различно в зависимости от вида и штамма гриба, условий выращивания и состояния культуры. Обычно плодовые тела появляются на достаточном количестве мицелия через 3—12 нед. У болетального гриба *Phlebopus sulphureus* (Fr.) Sing. плодовые тела, достигавшие 8 см высоты, были получены в культуре после пересевов в течение 2 лет. Длительный срок выращивания культуры, предшествующий образованию плодовых тел, требует достаточного количества питательной среды. Для получения плодовых тел можно использовать колбы, большие пробирки, банки из-под варенья, бутылки, у которых удалено дно. В последнем случае бутылки заполняют опилками, закрывают с обеих концов корковыми или ватными пробками и производят посев через горлышко. Засеянные мицелием бутылки переворачивают кверху дном. Мицелий прорастает всю среду, и в верхней части сосуда образуются плодовые тела, пробки к этому времени следует удалить.

Для получения плодовых тел некоторых видов рода *Agaricus* используется метод «чашечных половинок» Эгера [103]. Чашки Петри заполняют компостированным конским навозом или таким же навозом в сочетании с дерновой почвой в соотношении 7 : 3; 1 : 1. Чашки с навозом стерилизуют и инокулируют мицелием, выращенным на зерне с последующей инкубацией при 24° С. Через 10—14 сут после инокуляции пустую половинку чашки Петри засыпают увлажненной смесью дерновой земли, низинного торфа и мела в соотношении 2 : 1 : 0,03. Дальнейшую инкубацию чашек проводят под стеклянным колпаком при комнатной температуре и естественном освещении. При появлении зачатков плодовых тел земляной слой слегка увлажняют и чашки периодически вынимают из-под колпаков. Этим методом впервые были получены плодовые тела *Agaricus silvaticus* [103].

Оптимальная для плодоношения температура, различная для разных видов грибов определяется, очевидно, экологическими условиями, в которых происходит плодоношение этих грибов, и часто не совпадает с оптимальной для роста мицелия температурой. К группе грибов, у которых плодоношение наблюдается при температуре не выше 24° С, а оптимум — около 20° С, относятся *Flammulina velutipes*, *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus sapidus*, *Hericiium erinaceus* и др. Для получения обильного плодоношения «зимнего гриба» *Flammulina velutipes* необходимо понижение температуры до 5—10° С как минимум в течение 2 сут или до 15° С в течение 0,5 сут с последующей инкубацией при температуре не выше 20° С. Бурное образование плодовых тел этого гриба происходит при 10—15° С, в то время как оптимальная для роста мицелия температура находится в пределах 22—26° С. Плодоношению *F. velutipes* способствуют также колебания температуры

в пределах 5 и 20° С. Увеличению числа плодовых тел *Serpula lacrymans* способствует снижение температуры до 13—14° С в течение 8 дней.

К группе грибов с оптимумом плодоношения при температуре 20—24° С и максимумом при 28° С относятся *Pholiota adiposa*, *Auricularia auricula*, *Agaricus bitorquis*, *A. rubellus* Gill., *Tremella fuciformis* и др. К видам с оптимумом плодоношения при температуре 24—27° С и максимумом при 30—36° С относятся *Oudemansiella radicata*, *Coprinus lagopus*, *Pleurotus rhodophyllus*, *Ganoderma lucidum* и др. Температура 25° С благоприятна как для плодоношения *Coprinus lagopus*, так и для роста мицелия этого гриба.

К наиболее существенным условиям развития плодовых тел относится свет. У многих видов в темноте или при недостаточном освещении образуются лишь зачатки плодовых тел в виде цилиндрических или иной формы выростов. Интенсивность и продолжительность освещения влияют на сроки появления плодоношения, размеры, окраску, форму, степень развития плодовых тел. Обычно используют рассеянный солнечный или искусственный дневной свет. Образование плодовых тел у *Flammulina velutipes* и *Coprinus lagopus*, стимулируется синей частью спектра видимого света (наиболее эффективен свет с длиной волны 520 мкм). Появлению большого количества спорофоров у *Lenzites abietina* способствует освещение фиолетовой частью спектра, в меньшей степени — синей, зеленой, желтой и красной. Образованию плодовых тел целого ряда высших базидиомицетов способствует освещение голубым светом, очень слабое действие оказывает красный свет.

Потребность разных видов грибов в свете различна. На первых стадиях развития зачатков плодовых тел достаточно незначительного освещения. Для образования зачатков плодовых тел у *Rapus fragilis* требуется лишь 1,5 ч дневного освещения, для образования же сформированных плодовых тел необходимо освещение в течение более 6 ч. Плодовые тела *Polyporus versicolor* L. ex Fr. образуются при освещенности 1 тыс. лк в течение не менее 8 ч, *Pleurotus ostreatus* — 2—8 тыс. лк в течение 14 ч. Плодовые тела *Flammulina velutipes* могут быть получены лишь при слабой освещенности. Без света образуются зачатки плодовых тел у *Auricularia auricula*, *Pholiota adiposa*, *Flammulina velutipes*, *Agaricus bitorquis* и некоторых др. Свет необходим для образования зачатков и развития плодовых тел *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Armillariella mellea*, *Volvariella bombycina* (Pers. ex Fr.) Sing., *Pleurotus sapidus* Kalcher, *Tremella fuciformis* Berk. и др. Увеличение экспозиции и интенсивности света приводит обычно к более раннему и обильному образованию плодовых тел, их нормальному формированию и пигментации.

Аэрация и влажность оказывают влияние на образование и формирование плодовых тел. Снабжение культур свежим воздухом с относительной влажностью 80—90% благоприятно сказывается на развитии плодовых тел. При высоком содержании в среде углекислого газа появляются abortивные плодовые тела, задерживается развитие шляпки, изменяются ее размеры и происходят морфологические изменения. Если воздух не обновляется, то могут образовываться лишь зачатки плодовых тел. Образование ненормально развитых шляпок, появление новообразований может быть обусловлено действием паров минеральных масел, каменноугольного дегтя и др. При низкой транспирации число плодоношений уменьшается, рост шляпки подавляется, особенно у грибов семейства *Polyporaceae*.

Полученные в культуре плодовые тела должны быть идентифицированы по морфологическим признакам, характерным для плодовых тел, произрастающих в природных условиях.

ХІХ.3.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НА ЖИДКИХ СРЕДАХ

ХІХ.3.2.1. МЕТОД ПОВЕРХНОСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Мицелий можно выращивать на жидких средах поверхностно, т. е. в стационарной культуре (в этом случае гриб образует в поверхностном слое жидкости более или менее плотную мицелиальную пленку), и погруженно, т. е. в жидкости. К недостаткам поверхностного культивирования относятся неблагоприятные и неодинаковые условия развития мицелия: воздушный мицелий плохо снабжается питательными веществами и хорошо обеспечен кислородом, а субстратный мицелий, напротив, развивается в анаэробных условиях, но при этом тесно контактирует с питательной средой. Обычно мицелий растет при поверхностном культивировании гораздо медленнее, чем при погруженном, однако бывают исключения из этого правила. Условия погруженного культивирования более благоприятны для роста мицелия, но повышенная аэрация может подавлять, например, активность некоторых ферментов [281, 283].

Гриб, образующий на поверхности жидкости мицелиальную пленку, может развиваться нормально при непрерывном обновлении питательной среды и удалении токсических продуктов обмена веществ т. е. в проточной среде. Метод поверхностного культивирования, предложенный В. Я. Частухиным и М. А. Николаевской [466], заключается

в следующем. Культуру гриба выращивают в плоскодонной колбе (рис. 132, 3), ко дну которой припаяна сливная трубка с двумя отводами. На концы стеклянных трубок надевают резиновые трубки с зажимами. Колба с дистиллированной водой (4), колбы с питательной средой (2), колба с водой (1) для промывки колбы 2 соединены между собой и с колбой 3 с помощью стеклянных колпачков и резиновых трубок с зажимами. При такой системе выращивания можно многократно менять питательную среду, промывать мицелиальные пленки для удаления продуктов метаболизма и вносить дополнительную культуру какого-нибудь микроорганизма. Этим методом удалось проследить полный цикл развития *Lepiota procera*, *Coprinus raditus*, *Clitocybe nebularis*, *Armillariella mellea* и других грибов.

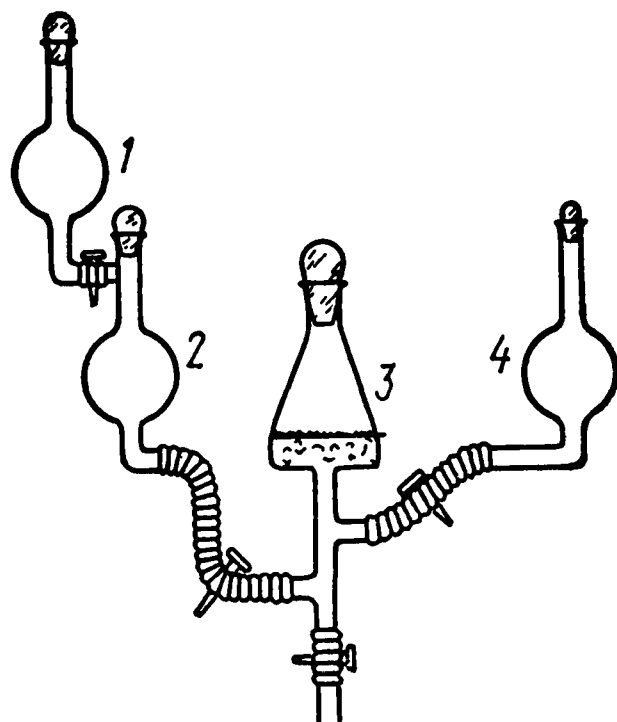


Рис. 132. Выращивание высших базидиальных грибов методом Частухина:

1 — колба с водой для промывания колбы 2; 2 — колба с питательной средой; 3 — колба для выращивания грибов; 4 — колба с дистиллированной водой.

ХІХ.3.2.2. МЕТОД ПОГРУЖЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Метод погруженного культивирования обладает рядом преимуществ по сравнению с поверхностным. Механическое перемешивание и непрерывная аэрация способствуют доступу питательных веществ и кислорода ко всем клеткам мицелия, обеспечивая одинаково благоприятные условия для роста и накопления продуктов метаболизма. Погруженное выращивание требует строго определенных условий, соответствующих физиологическим потребностям гриба, и соблюдения стерильности на всех этапах (см. раздел III.4). Одним из существенных условий успешного выращивания грибницы является правильная подготовка посевного материала (инокулюма). До посева на жидкую среду мицелий сохраняют на твердых питательных средах различного состава в зависимости от биологических особенностей штамма: сушлом агаре, опилках, соломе и т. д., обычно в холодильнике. Вегетативный мицелий съедобных грибов, как правило, не дает спороношений или спороносит слабо, что диктует необходимость засева ферментационной среды механически измельченным мицелием. Известно [568], что измельченный в смесителе мицелий, отдельные участки гиф которого состоят из нескольких клеток, в разведении 1 : 40 000 заменяет необработанный мицелий в разведении 1 : 10. Измельчают мицелий в стерильных гомогенизаторах. В процессе ферментации ведется контроль за основными параметрами — накоплением биомассы, белка или интересующих метаболитов в мицелии, расходом питательных компонентов, изменением рН среды, аэрацией, скоростью перемешивания, температурой. Для этого через определенные промежутки времени или по фазам роста гриба производят отбор проб.

Оптимальные температурный, кислородный режимы и скорость перемешивания определяют предварительно и поддерживают автоматически или регулируют с помощью аппаратуры. Чрезвычайно важно поддержание режима рН среды, так как резкие колебания кислотности, свидетельствующие об изменении условий культивирования или состояния культуры в неблагоприятную сторону, могут привести к ее быстрой гибели. По немногочисленным литературным данным, расход воздуха в начале ферментации составляет примерно 1 объем на 1 объем среды в 1 мин. К концу ферментации, когда накапливается большое количество мицелия, расход воздуха может быть увеличен. Число оборотов мешалки составляет 150—300 в минуту и может быть увеличено по мере нарастания биомассы.

На реологические свойства культуры влияет форма мицелия (в виде клубочков, агломератов, нитей). При шариковом росте, несмотря на высокую концентрацию кислорода в среде, диффузия его в мицелий минимальна и в центре шариков создаются анаэробные условия, что приводит к накоплению метаболитов и снижению урожая. При нитчатом росте, когда культура напоминает густой «суп», в культуральной жидкости наблюдаются переплетенные, ветвящиеся обрывки мицелия или тяжи, склонные к агломерации. Образование этих структур во многом зависит от разбивающего действия ферментера, состава питательной среды, уровня рН. Для роста мицелия многих видов грибов оптимальна температура 25—28° С.

Если в процессе ферментации образуется обильная пена, то одновременно с внесением посевного материала в ферментер добавляют 0,05—0,1% (к объему среды) пеногасителя (например, подсолнечное масло).

Способ обработки мицелиальной массы зависит главным образом от назначения продукта ферментации. Для получения грибного порош-

ка, используемого в качестве приправы, применяют лиофильную и другие виды сушки, для обезвоживания — центрифугирование и т. д. При получении пищевого мицелия одной из важных задач является сохранение у конечного продукта вкусовых свойств гриба. Использование культурального мицелия в пищу в значительной степени зависит от наличия грибного аромата в свежих, сушеных и консервированных продуктах. Поэтому при культивировании мицелия съедобных грибов для пищевых целей большое внимание следует уделять сохранению и усилению грибного аромата.

Химическими исследованиями ароматических веществ в плодовых телах многих съедобных грибов установлено, что основу грибного аромата создают (—)1-октен-3-ол и гуанозин-5-монофосфат (5-ГМФ), а также глютаминовая кислота, запах которой в значительной мере стимулируется двумя первыми соединениями [554, 562, 828]. Показано, что наличие этих же веществ обуславливает грибной аромат культурального мицелия и жидкости при погруженном выращивании, причем у некоторых видов культуральный мицелий богаче ароматизирующими веществами, чем плодовые тела. При погруженном культивировании (—)1-октен-3-ол образуется на более ранних этапах роста, а 5-ГМФ значительно позже, что связано, очевидно, с автолизным разрушением РНК. Усилению запаха и одновременно увеличению продукции мицелия способствует добавление в питательную среду овощных экстрактов, снятого молока и других субстратов, обогащенных углеводами [562].

Оптимальный рост мицелия большинства изученных съедобных грибов получен на средах с добавлением различных сложных природных субстратов (дрожжевой автолизат, пивное сусло, мальт-экстракт, отвары, экстракты растений и т. п.). Для получения максимального роста культур применяют сложные полусинтетические среды. Органические субстраты, входящие в состав этих питательных сред, являются обычно также стимуляторами роста. Некоторые органические субстраты имеют, однако, непостоянный состав (см. приложение 10).

XX. ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР ГРИБОВ

XX.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Методы хранения культур должны обеспечивать сохранение типичных морфологических, культуральных признаков и физиологических свойств. Сохранность и выживаемость коллекционных культур зависят от состава, рН, температуры, влажности питательной среды и т. п. Наиболее пригодны для длительного хранения культур при периодических пересевах плотные среды, имеющие относительно низкую влажность и способные терять ее постепенно. Полужидкие и жидкие среды применяют только для отдельных видов, когда применение плотных сред невозможно.

Для хранения используют: а) природные субстраты (специально обработанное зерно злаков, корнеплоды и др.); б) искусственные среды, полученные путем переработки природных субстратов с добавкой агар-агара или желатина; в) иногда — синтетические агаризованные среды с добавкой специфических экстрактов, соков, отваров. Для хранения большинства видов грибов разработан ряд стандартных питательных сред. Лишь некоторые виды нуждаются в специфических средах, которые обычно состоят из естественного субстрата или синтетической среды с добавкой вытяжки, сока, экстракта или отвара тех субстратов, из которых гриб выделен. Вытяжки (настои) готовят на холоду, без кипячения, иногда с легким подогревом. Как правило, настаивают 100—150 г субстрата в 1 л воды в течение от нескольких часов до суток. Настой сливают, фильтруют и стерилизуют. Отвары готовят кипячением определенной навески субстрата в 1 л воды в течение часа (например, гороха или бобов — 100 г, кукурузной муки — 500, картофеля — 250—300, овсяной муки — 50—100 г). Для приготовления отваров из сухих субстратов берут не более 50 г субстрата на 1 л. Во всех случаях после варки объем воды доводят до исходного. Затем отвар фильтруют, при необходимости осаждают или подкисляют, разливают в микробиологическую посуду и стерилизуют. Для приготовления агаризованных сред добавляют к фильтратам 1,5—3% агара. Наиболее часто для хранения применяют сусло-агар или другие агаризованные среды. Приготовленные субстраты после стерилизации проверяют на стерильность. Для этого пробирки, флаконы или ампулы с субстратом заливают питательной средой и выдерживают в термостате при 28° С неделю, а затем уже всю партию высевают на хранение. Для обеспечения организма разнообразными питательными веществами некоторые исследователи рекомендуют при пересевах смену субстратов, в частности синтетических растительными, или

добавление к синтетическим средам органических субстратов (кусочков стеблей, коры и др.).

Температура имеет также большое значение для поддержания стабильности культуры при хранении. Частые пересевы при некоторых методах хранения, как правило, связаны с пересыханием культур. Обычно высушенные культуры в запаянных ампулах хранят при комнатной температуре (18—20° С). Пересеянные на твердые субстраты культуры тоже можно хранить при комнатной температуре, но оптимальной для хранения культур между пересевами считается температура 4—5° С.

Генетическая однородность материала, который закладывают на хранение, играет существенное значение для поддержания стабильности культуры. Гетерогенность чаще проявляется при выращивании культур из спор, реже — из вегетативного мицелия. Стабильность при хранении значительно выше у односпоровых культур. Отмечено, что утрата способности образовывать склероции некоторыми пенициллами может быть ингибирована, если культуры для хранения были выращены из одного склероция.

При пересевах обильно спороносящих культур, в частности при периодических пересевах, переносить на среду следует минимальное количество спор (конидий). При пересеве неспорообразующих форм кусочки мицелия нужно брать из краевой зоны колонии, так как, если мицелий берется из середины колонии, где накапливаются продукты обмена, изменчивость культур повышается.

Для предупреждения гибели культур рекомендуется хранить их одновременно несколькими способами, не менее чем в двух коллекциях и периодически пересевать на свежие питательные среды. Независимо от способа хранения необходимо вести микроскопический контроль за чистотой культуры, а в случае хранения продуцентов биологически активных веществ — биохимический контроль активности.

XX.2. МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР ГРИБОВ

XX.2.1. ХРАНЕНИЕ НА АГАРИЗОВАННЫХ СРЕДАХ

XX.2.1.1. ПЕРИОДИЧЕСКИЕ ПЕРЕСЕВЫ

Метод периодических пересевов на свежие питательные среды является классическим и довольно распространенным. Положительными сторонами этого метода являются постоянная доступность культур для работы и возможность непосредственного контроля за их чистотой.

В пробирки заливают агаризованную среду, оптимальную для хранения данной культуры, стерилизуют при 0,5 атм 30 мин и при застывании слегка скашивают. Высота столбика среды 5—6 см. В большинстве случаев не следует употреблять свежеприготовленные среды, содержащие конденсационную воду. Их следует слегка подсушить при комнатной температуре в течение 10—12 дней. Пересев культуры гриба производят путем переноса инокулюма из жидкой среды или кусочков воздушного и субстратного мицелия или спор (конидий, склероциев) из плотной среды. Затем культуры выращивают при оптимальной для их роста температуре до появления спороношений. В течение первых дней желательно вести наблюдение за ростом, так как в это время легче обнаружить загрязнение. Выращенные культуры закрывают колпачками из фильтровальной или другой влагопрони-

цаемой бумаги. Л. Рихардсон [754] предлагает закрывать пробирки с чистыми культурами металлическими колпачками, покрытыми в промежутке между стеклом и металлом пленкой «Parafilm» или «Saran Wgar». Таким образом, культуры защищены не только от пересыхания, но и от загрязнения другими грибами и клещами и могут храниться в течение 6 лет. Оптимальная температура хранения 4—5° С [754], допускается хранение при 15—18° С.

Большинство культур пересевается 1—3 раза в год. Обычно для грибов, обильно спороносящих или образующих хламидоспоры и склероции, интервал между посевами больше. Однако при этом нередко существенно изменяются морфолого-физиологические признаки грибов, а иногда наблюдается потеря отдельных свойств. Дегенерация культур выражается в изменении размеров и формы конидиеносцев и спорангиеносцев, в полной утрате спорообразования или резком сокращении количества спор, в изменении размеров клеток мицелия и перерождении их содержимого, утрате полового спороношения и способности образовывать склероции и пр. Часто изменяется вид всей колонии гриба — образуются слизистые, складчатые и другие не свойственные виду формы. Потеря признаков и свойств возрастает как с увеличением числа посевов, так и при посевах с большими промежутками. Правда, некоторые виды и роды хранятся этим способом без изменения очень длительное время. В крупнейших коллекциях мира часто прибегают к такому способу хранения культур грибов. Однако возможность изменения морфолого-физиологических и других свойств организмов, повышение вероятности инфицирования культур при частых посевах привели к поискам других методов длительного хранения культур.

XX.2.1.2. ХРАНЕНИЕ ПОД ВАЗЕЛИНОВЫМ МАСЛОМ

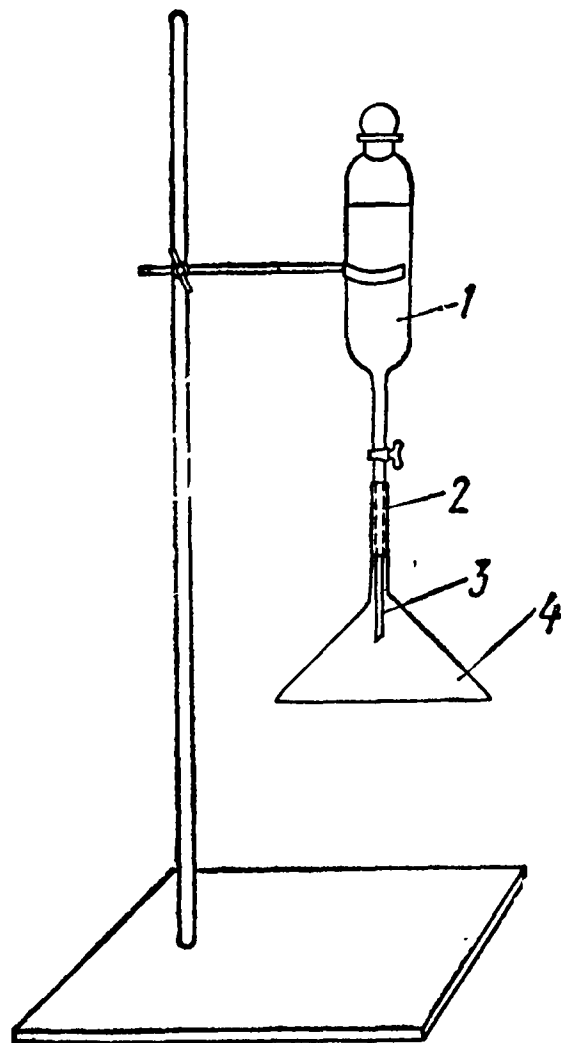
Широко распространенный метод. Он значительно увеличивает период выживаемости грибов на косяках агара (до 3 лет и более), не требует дорогостоящего оборудования, скор и прост, предохраняет культуры от клещей. Основной недостаток метода — разбрызгивание масла со спорами при обжигании иглы во время посевов, вследствие чего инфекция может распространиться в лаборатории. Этого можно избежать, медленно прогревая иглу или опуская ее предварительно в сосуд с водой.

Масло уменьшает доступ кислорода к культуре и предотвращает высыхание, однако полностью не изолирует культуру от воздуха, поэтому последняя продолжает слабо развиваться и расти. Масло должно быть высоко очищенным с удельным весом 0,8—0,9 г/см³. Лучшим является медицинское вазелиновое масло. Перед заливом масло стерилизуют в автоклаве или сушильном шкафу при 150—170° С в течение 1—2 ч. Культуры выращивают на природной среде, как правило агаризованной, застывшей в виде короткого косяка, обычно 2-недельного возраста. Слой масла в пробирке не должен превышать 1 см. Более тонкий слой не предохраняет культуру от высыхания, а под толстым слоем культуры могут погибнуть от недостатка того минимума кислорода, который необходим для сохранения жизни культуры. Культуры из-под масла необходимо пересевать на свежие среды первый раз через год после погружения под масло, а затем каждые 2—3 года. Если через год культуры утратили жизнеспособность, то их восстанавливают из коллекции, поддерживаемой периодическими посевами, вновь погружают под масло и пересевают в более короткие сроки

Рис. 133. Прибор для заливки культур дрожжей вазелиновым маслом [527]:

1 — делительная воронка, наполненная вазелиновым маслом; 2 — резиновая трубка; 3 — нижний конец делительной воронки; 4 — обычная химическая воронка.

[35]. Сконструирован специальный прибор для разлива масла [527], который стерилизуется в автоклаве. Прибор укрепляют на штативе, в делительную воронку наливают стерильное масло, которое затем разливают по пробиркам. Кончик делительной воронки, оттянутый в тонкую трубку, пропущен через стеклянную воронку, перевернутую раструбом вниз (рис. 133). Обе воронки скреплены резиновой трубкой. Во избежание загрязнения культур для заливки маслом каждой культуры используют отдельные флаконы [559]. При этом загрязнение культур обнаружилось в 0,6% пробирок [35]. Культуры, залитые маслом, могут храниться без пересевов 3—6 и более лет [527, 677]. Большин-



ство культур грибов под маслом целесообразно хранить при 4° С. Хорошая выживаемость под вазелиновым маслом свойственна многим видам грибов [240, 241]. В частности, спорообразующие культуры обладают хорошей устойчивостью при хранении под маслом и после пересева многие из них сохраняют морфологические и физиолого-биохимические свойства [527]. Хорошая выживаемость под маслом отмечена у базидиомицетов, дискомицетов, некоторых патогенных для человека штаммов. Особенно важен этот метод для хранения неспорозных форм грибов, которые плохо поддаются лиофилизации [210, 430].

XX.2.2. ХРАНЕНИЕ НА ЕСТЕСТВЕННЫХ СУБСТРАТАХ

Методы хранения культур на естественных субстратах давно нашли широкое применение и некоторые из них используются наряду с лиофилизацией в промышленных лабораториях и коллекциях для хранения споровых форм — это хранение на зерне, в почве, песке.

XX.2.2.1. ХРАНЕНИЕ НА ПШЕНЕ (ЗЕРНЕ)

В пробирки или флаконы вносят соответственно по 5—10 и 10—15 г чистого сухого пшена. Закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при давлении 1,5—2 атм в течение 0,5 ч. Сухое пшено стерилизуют дважды с интервалом до 24 ч. После второй стерилизации в пробирки с пшеном добавляют 60—70% стерильной водопроводной воды и стерилизуют еще раз. Сразу после последней стерилизации пробирки с пшеном следует встряхнуть, чтобы при охлаждении не образовались комки. Засевают культуру 1 мл суспензии в стерильной водопроводной воде конидий гриба, выращиваемого на косяках сусло-агара в течение 2 нед, или спорами либо конидиями 2-недельного возраста, которые снимают с поверхности колоний. Пробирки и флаконы встряхивают для равномерного распределения конидий. Культуры

выращивают при оптимальной для них температуре до получения спороношения. Выращенную культуру высушивают в вакуум-аппарате при 24—25° С в течение 2—3 сут. Абсолютная влажность после сушки не должна превышать 6—8%. По окончании сушки пробирки и флаконы парафинируют и хранят при комнатной температуре. Аналогичным образом хранят культуры грибов на просе и других сортах зерна. Этот метод пригоден также для получения посевного материала (инокулюма). Срок годности культур в этом случае 1 год [241, 325].

XX.2.2.2. ХРАНЕНИЕ В СТЕРИЛЬНОЙ ПОЧВЕ

Садовую почву тщательно просеивают через мелкое сито, переносят по 5 г в пробирки и ежедневно в течение 3 дней стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при давлении $1,51 \cdot 10^5$ Па. Споры и мицелий культуры, растущей на агаре Чапека или сусло-агаре, снимают петлей и в несколько приемов переносят в пробирку со стерильной почвой. Ватные пробки в пробирках обрезают вровень с пробиркой и заливают парафином. Пробирки заворачивают в бумагу и хранят при комнатной температуре [427]. Метод более пригоден для хранения многих культур, в частности видов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucorales*, некоторых патогенных форм, чем хранение под вазелиновым маслом. Процент выживаемости спор достаточно высок через 5 и даже 7—10 лет [427, 504, 582, 609].

XX.2.2.3. ХРАНЕНИЕ В КВАРЦЕВОМ ПЕСКЕ

Речной песок промывают в проточной воде 5—6 ч, прокаливают 0,5 ч для удаления органических примесей, охлаждают и просеивают сквозь мелкое сито. Просеянный песок насыпают в стеклянные ампулы и дважды стерилизуют при 120° С в течение часа. Споры 2-недельного возраста снимают петлей с поверхности колоний, выращенных на косяках агара, и в несколько приемов переносят в ампулы с песком, которые закрывают ватными пробками. Ампулы со споровым материалом подсушивают в термостате при 37° С 2—3 сут, заливают ватные пробки парафином и хранят при комнатной температуре. Этот метод достаточно эффективен для хранения видов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, однако некоторые виды *Penicillium* при этом теряют способность образовывать склероции [241].

XX.2.3. ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР В ВЫСУШЕННОМ СОСТОЯНИИ

Известно много случаев выживания культур на естественно высохших субстратах (*Aspergillus*, *Penicillium* и др.). При хранении культур на агаризованной среде в высохшем состоянии отмечается утрата сумчатого спороношения и способности образовывать склероции у некоторых пенициллов и аспергиллов [241, 410, 430]. Культуры *Stachybotrys alternans*, сохранявшегося на фильтровальной бумаге в высохшем состоянии при комнатной температуре, сохраняли морфологические, физиологические и токсические свойства в течение 15 лет [444]. Преднамеренное высушивание также нашло широкое применение в микологической практике. Длительное время на пшене без изменения антибактериальной активности хранится продуцент пенициллина *Penicillium chrysogenum* [225, 241]. Самым надежным ме-

тодом хранения *Pen. vitale* — продуцента глюкозооксидазы и каталазы — является хранение на просе [325]. Наряду с преднамеренным высушиванием на естественных субстратах давно используют искусственное медленное (при подогреве) или быстрое (под вакуумом) высушивание суспензии спор. Субстратом для высушивания суспензий может служить фильтровальная бумага, кусочки травы, силикагель. В качестве суспензионной среды используют обезжиренное молоко. Выживаемость культур выше при быстром высушивании и медленном насыщении влагой при восстановлении.

XX.2.3.1. ХРАНЕНИЕ НА БЕЗВОДНОМ СИЛИКАГЕЛЕ (МЕТОД ПЕРКИНСА)

Споры или мицелий, суспендированные в снятом молоке, адсорбируют на безводный силикагель, который хранят при соответствующих температурах. Ампулы или пробирки (13×100 мм) до половины наполняют безводным силикагелем. Силикагель содержит красящее вещество — индикатор на влажность, которая губительна для культур при хранении. Ампулы стерилизуют сухим жаром при 180°C 1,5 ч и хранят в плотно запломбированных контейнерах. Для приготовления суспензии спор используют культуры 5-дневного возраста, выращенные на сусло-агаре. С этой целью 0,5 мл смыва суспензии конидий или мицелия с одного косяка агара переносят в пробирку или ампулу с силикагелем. Частички силикагеля пропитываются полностью, но через 12 ч становятся поверхностно сухими и легко рассыпаются при встряхивании. Выдержанные неделю образцы проверяют на выживаемость. Для этого на подготовленный косяк агара вытряхивают несколько частичек силикагеля и помещают в термостат. Культуры, заготовленные для длительного хранения, парафинируют и хранят при 5°C в закупоренных пластмассовых боксах. Этим методом хранилось более 700 штаммов *Neurospora crassa*. Обезжиренное молоко в качестве суспензионной среды оказалось более эффективным, чем дистиллированная вода — 90% культур оставались живыми при хранении в течение 1—6 лет. Нежизнеспособными оказались штаммы, слабо или совсем не образующие конидий [729]. Метод Перкинса был использован для длительного хранения культур 33 видов бактерий и 22 видов грибов. При комнатной температуре через год и более выживаемость грибов составляла 77, через 3—4 г — 33%. Жизнеспособность увеличивалась в 2—3 раза при хранении культур при температуре 4°C [815].

XX.2.3.2. ЛИОФИЛИЗАЦИЯ

Лиофилизация, или высушивание из замороженного состояния под вакуумом, заключается в том, что вода при пониженном давлении удаляется из высушиваемого материала путем превращения льда непосредственно в пар, минуя жидкое состояние.

Готовят густую взвесь спор в нормальной лошадиной сыворотке без консерванта или в жидкости, состоящей из 10% сахарозы и 1% желатина. Суспензию разливают пастеровской пипеткой по 0,2 мл в стеклянные ампулы с перетяжкой. Ампулы замораживают, погружая на 20 мин в смесь твердой углекислоты с этиловым спиртом от -60 до -68°C , и помещают в вакуум-аппарат с остаточным давлением около 100 мм рт. ст. Длительность сушки зависит от мощности вакуум-насоса и количества высушиваемого материала [241]. Достаточно эффективно высушивание в течение 1—1,5 ч в вакууме под давлением

200—500 мм рт. ст. Остаточная влажность высушенного материала не должна превышать 5%. Лиофилизации в большинстве случаев подвергают густые суспензии спор, для получения которых микроорганизмы, в том числе и грибы, следует выращивать в оптимальных для них условиях, но на средах, которые не вызывают пышного роста мицелия. У обильно спороносящих культур выживаемость выше [616]. Лучшие результаты получают при лиофилизации микроорганизмов в логарифмической фазе роста [582, 721, 733].

Особо важное значение для лиофилизации имеют среды. Они представлены тремя основными группами: а) коллоидные животного, растительного и минерального происхождения (сыворотка крови, плазма, снятое молоко, агар-агар, гель гидрата окиси алюминия, желатин и др.); б) содержащие углеводы (обычно 1—10%-ные растворы сахарозы, лактозы, глюкозы) и продукты гидролиза белков, такие, как пептон и аминокислоты; в) сложные, в состав которых входят вещества, образующие как коллоидные, так и истинные растворы [65]. Для лиофилизации грибов используют сыворотку крови, снятое молоко, растворы сахаров и др. При изучении режима лиофилизации спор *Asp. niger* было отмечено, что при добавлении в среду высушивания 20% сахарозы или глюкозы выживаемость повышается до 81—85% независимо от режима замораживания, температуры и скорости лиофилизации [611]. Добавление в среду высушивания сахарозы или глюкозы не влияет на температуру хранения и остаточную влажность препарата.

Замораживание высушиваемого объекта должно быть полным. Суспензию спор быстро замораживают в высоком вакууме (10^{-3} — 10^{-4} мм рт. ст.) или при атмосферном давлении с помощью сухого льда, жидкого воздуха, жидкого кислорода, охлаждающих смесей. При применении охлаждающих смесей процесс происходит медленнее, чем в вакууме. В вакууме можно осуществлять замораживание со скоростью от нескольких градусов в секунду и нескольких градусов в минуту до сотен градусов в секунду (сверхбыстрое замораживание) [565]. Обычно замораживание грибов при лиофилизации проводят при температурах от -45 до -68°C [210, 241].

Выживаемость лиофилизированных культур зависит от режима лиофилизации, т. е. от скорости и условий замораживания и высушивания. Влияние различной температуры замораживания и высушивания изучено на примере лиофилизации спор *Asp. niger* [611]. В первом случае споры замораживали при -10°C и высушивали при минусовой температуре; во втором — замораживали при -35 и -65°C , а высушивали при комнатной температуре; в третьем — культуру охлаждали самозамораживанием при центрифугировании. При первых двух режимах сохранялось 10—70% жизнеспособных спор, а при последнем — до 47—87%. Как правило, после окончания процесса лиофилизации следует установить жизнеспособность высушенных культур.

Остаточная влажность оказывает большое влияние на выживаемость и сохранение свойств лиофилизированных культур. Для грибов остаточная влажность не должна превышать 4—5%.

Обычно лиофилизированные культуры хранят при комнатной температуре. Между температурой хранения лиофилизированных микроорганизмов и скоростью отмирания существует прямая зависимость [65]. Опыт показал, что лучше сохранять культуру после лиофилизации при пониженной температуре (от 0 до -10°C) [65, 611] в темноте [616]. Жизнеспособность лиофилизированных культур зависит от методов выведения их из состояния анабиоза, выбор которых определяет

ся особенностями организмов, интенсивностью их высушивания, продолжительностью хранения и пр. Важное значение при восстановлении культур имеет скорость регидратации. Ампулы с лиофилизированной культурой открывают следующим образом. Снаружи ампулу дезинфицируют спиртом или другим способом, затем надрезают ее специальной пилкой. Стерильной пастеровской пипеткой в препарат вносят несколько капель стерильной воды или питательной среды, в которой будет развиваться грибок. Полученной суспензией засевают агаровую среду. Выведение живых клеток из состояния анабиоза протекает успешней, если посев производят не сразу, а суспензию или споры выдерживают некоторое время во влажной атмосфере. При определении жизнеспособности клеток необходимо соблюдать условия восстановления лиофилизированных культур.

XX.2.4. КРИОГЕННЫЙ МЕТОД ХРАНЕНИЯ

Метод хранения коллекционных культур при температурах ниже 0°C применяют давно и к настоящему времени накопилось много сведений о влиянии низких температур на микроорганизмы. Большинство из них легко переносят замораживание и длительное время сохраняют жизнеспособность. Замораживанию с помощью жидкого азота подвергают культуры грибов на питательных средах, воздушно-сухие споры и суспензии спор.

0,5—1,0 мл суспензии клеток или конидий концентрацией $(1,69—5,88) \cdot 10^5$ клеток/мл вносят в стерильную ампулу или пробирку. При необходимости замораживания большого объема суспензий их наливают во флаконы с таким расчетом, чтобы в процессе замораживания можно было равномерно распределить суспензию по стенке флакона, так чтобы толщина замороженного слоя не превышала 1 см. Затем ампулы или пробирки медленно охлаждают до -35°C (со скоростью $1^{\circ}/\text{мин}$) с помощью специальной аппаратуры [593] или пробирки с суспензией диаметром 1 см помещают во вторую, более широкую диаметром 4,5 см; пространство между стенками широкой и узкой пробирок заполняют теплоизоляционным пластиком — мипорой [392]. Скорость охлаждения определяют термпарой. После достижения образцами -35°C охлаждение ведется быстрее. Пробирки или ампулы переводят в газовую фазу рефрижератора (от -160 до -196°C) или погружают в сосуд Дюара с жидким кислородом (-183°C). Пробирки и ампулы запаивают в холодильной камере. Культуры хранят при температуре от -150 до -196°C в специальных камерах.

При восстановлении культур их подвергают быстрому оттаиванию. Для этого ампулы или пробирки с замороженными культурами погружают в водяную баню при температуре 38°C и встряхивают. После оттаивания культуры ресуспендируют в холодной воде ($2—3^{\circ}\text{C}$) [593, 600, 629, 630]. Суспензию высевают на питательную среду.

Испытан метод хранения грибов в жидком азоте с использованием полиацетатной пленки вместо стеклянных ампул, флаконов или пробирок. Споры *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Trichoderma* и представителей других родов при хранении в полиацетатных пакетиках оставались жизнеспособными 7 и более месяцев [819]. Устойчивость культур грибов к замораживанию, их выживаемость и последующее восстановление зависят от ряда условий.

Внезапное падение температуры до 0°C или ниже губительно влияет на живые клетки вследствие температурного шока, избежать ко-

торый можно путем постепенного охлаждения в том же температурном интервале. Постепенное охлаждение обеспечивает так называемую температурную адаптацию. Методы криогенного хранения культур поэтому и основаны на медленном (около 1°/мин) охлаждении до —35° С и последующем быстром охлаждении до более низких температур. Культуры грибов в замороженном состоянии хранят при разной температуре, но лучшие результаты получены при температуре ниже —130° С [629, 641, 670, 819]. Колебание температуры при хранении недопустимо, а повторное замораживание и оттаивание губительны для организмов.

Некоторые среды понижают чувствительность клеток к действию холода. Обычно для этих целей применяют глицерин, количество которого должно достичь 15—20% объема суспензии. Присутствие глицерина обеспечивает не только обезвоживание живых клеток при замораживании, но и создает условия, наиболее благоприятные для обратной отдачи воды клеткам при оттаивании. Суспензионная среда должна содержать минимальные количества электролита. В качестве защитных сред кроме глицерина используют диметилсульфоксид (10—15%), сахарозу или лактозу (10—30%), желатозу — двукратно автоклавируемый желатин (5—10%), пептон (5%), обезжиренное молоко (30—50%), сыворотку крови, инактивированную в течение 1 ч при 56° С (30—50%). Хорошие результаты, например, получены при хранении патогенных штаммов в 10—15%-ном растворе дисульфоксида. Ресуспендированные конидии вызывали как локальную, так и общую инфекцию растений, в то время как жизнеспособность и патогенность конидий, замороженных в 10%-ном растворе глицерола и ресуспендированных в воде, значительно снижались и лишь у 5 из 35 зараженных растений сорго обнаруживалась локальная инфекция [593].

Скорость оттаивания оказывает значительное влияние на выживаемость. Максимальная скорость оттаивания [593, 600, 629, 670] гарантирует более высокий процент выживаемости, чем медленное оттаивание [392, 435, 600].

Криогенный метод пригоден для хранения грибов всех систематических групп, особенно удобен для чувствительных к лиофилизации, трудно культивируемых аспорогенных и патогенных форм. Криогенному хранению подлежат и те патогены, чьи конидии быстро теряют жизнеспособность и патогенность в обычных условиях хранения [442, 593, 628—630, 641].

XX.2.5. ДРУГИЕ МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ

Известны методы хранения грибов на других субстратах: разных видах почв, каолине, торфе, опилках [503, 504, 521]. Для хранения целлюлозоразрушающих грибов использовали фильтровальную бумагу, помещенную на сусло-агаре [559], для Oomycetes и Fungi imperfecti — хранение под керосином, для углеводородусваивающих грибов — среды с углеводородами [479].

Некоторые исследователи рекомендуют хранить грибы в холодной дистиллированной воде. Метод заключается в следующем: к 2-недельным культурам, развивающимся на косяках картофельно-декстрозного агара в пробирках 20 × 150 мм, добавляют 6—7 мл дистиллированной воды; суспензию спор и фрагментов мицелия переносят в стерильные стеклянные пробирки. Пробирки плотно закрывают и

хранят при комнатной температуре. При хранении в холодной дистиллированной воде в течение 5 лет выживаемость составляет 92—94%. Некоторые виды грибов, не выживающие на обычных средах, сохраняют жизнеспособность при хранении на дистиллированной воде.

Низкая выживаемость обнаружена у слабоспороносящих штаммов. Культуры эндомикоризных и фитопатогенных грибов выращивают на агаризованной среде в чашках Петри. Диски диаметром 8 мм помещают в стерильную дистиллированную воду в специальные трубки и хранят при температуре -5°C [566]. Виды рода *Ascochyta* сохраняют жизнеспособность при хранении на косяках агара, залитых стерильной водой, в течение 20—25 мес при $10-12^{\circ}\text{C}$ [732].

Для восстановления культур стерильно переносят 0,2—0,3 мл суспензии на свежую среду [598].

XX.3. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР ГРИБОВ

XX.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОЙ ВЛАЖНОСТИ

Свойства культур грибов после высушивания, регидратации и хранения в обычных и экстремальных условиях в значительной степени зависят от остаточной влажности. Так, частичное обезвоживание дрожжевых культур в 5%-ном растворе хлористого натрия и предварительное высушивание в термостате значительно повышают их выживаемость при охлаждении. Необработанные конидии *Asp. niger* быстрее погибают в парафиновом масле при повышении температуры, чем так называемые сухие, с которых дополнительной обработкой была удалена «поверхностная вода» [793]. Остаточная влажность оказывает значительное влияние на выживаемость и сохранение свойств лиофилизированных культур.

Существует несколько физических и химических методов определения остаточной влажности [323]. При анализе физическими методами влагу препаратов переводят в пар, который затем удаляют тем или иным способом или же собирают в определенном объеме. В первом случае количество влаги рассчитывают по разности массы пробы препарата до и после высушивания, во втором — по парциальному давлению пара. При химических методах анализа влага препаратов взаимодействует с соответствующим реактивом и количество образовавшихся продуктов определяют титрованием.

Показатели остаточной влажности могут варьировать в зависимости от метода анализа и состава препаратов. Поэтому результаты определения остаточной влажности, выражаемые обычно в процентах к массе сухого вещества, сравнимы лишь в том случае, если они получены одним и тем же методом. Так, при официальном контроле препаратов, изготовленных разными предприятиями и предназначенных для массового пользования, в СССР применяют ускоренный метод — досушивание образцов при 100°C в течение часа, в США — метод досушивания до постоянной массы над P_2O_5 в вакууме при комнатной температуре, в Англии — манометрический метод, в ряде стран Западной Европы — химический метод Фишера. Во всех случаях влагосодержание материала определяют отношением массы влаги GW , удаленной из материала к массе материала после высушивания GS , т. е. $X = GW/GS$. Массу влаги при этом можно определить прямым или косвенным методом. При прямом методе путем растворения, адсорб-

ции, отжима и т. п. определяют массу удаленной влаги и, зная начальную массу материала G_f , вычисляют массу сухого материала: $GS = G_f - GW$ и влагосодержание: $X = GW / (G_f - GW)$. Косвенным методом пользуются, если не удастся непосредственно измерить количество удаленной влаги. Массу влаги определяют как разность массы образца до сушки G_f и после ее окончания GS : $GW = G_f - GS$. Влагосодержание в этом случае равно: $X = (G_f - GS) / GS$. Поскольку условия сушки могут изменять массу высушиваемого материала, то при определении массы влаги этим методом может быть допущена ошибка, которую определяют по уравнению $\Delta X = [(G_f - GS) - GW] / GS$.

XX.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТА ВЫЖИВАЕМОСТИ

Независимо от метода хранения необходимо периодически вести контроль выживаемости культур. Для этого сравнивают количество живых клеток в препаратах перед хранением и после определенного периода хранения. Выживаемость лиофилизированных культур определяют также сразу после лиофилизации. При подготовке лиофилизированного материала к исследованию достаточно восстановить первоначальный объем материала путем добавления к нему воды или питательной среды. Когда масса потерянной воды неизвестна, то добавляют растворитель, объем которого равен исходному объему материала. В таком случае результаты исследования исходной суспензии и лиофилизированного материала будут сравнимы. Количество жизнеспособных клеток определяют при высеве суспензии на агаризованную среду в чашки Петри. По разности содержания жизнеспособных клеток в суспензиях до и после хранения (высушивания) с учетом степени разведения и дозы посева суспензии находят число конидий, сохранивших жизнеспособность в процессе хранения [323]. Количество жизнеспособных клеток можно определить и путем подсчета проросших и непроросших конидий или при определении всхожести спор на предметном стекле. Количество спор подсчитывают каждые 2 ч в течение суток [429].

Подсчет проросших спор проводят также во влажной камере. Споры проращивают в висячей капле стерильной среды. Для посева готовят такое разведение споровой суспензии, чтобы в капле было не более 10—15 конидий (спор). После инкубации при оптимальной температуре в течение 10—15 ч подсчитывают число проросших и непроросших конидий. В зависимости от особенностей хранившейся культуры инкубация бывает более длительной. Общее количество просмотренных конидий в каждой партии материала составляет 400—500. Отношение проросших конидий к общему количеству просмотренных, выраженное в процентах, и определяет всхожесть культуры после хранения.

XX.3.3. «ОЖИВЛЕНИЕ» КУЛЬТУР И ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ УТРАЧЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

При длительном хранении культуры без контроля на выживаемость обычный перенос спор воздушного мицелия или суспензии на свежую питательную среду не всегда дает положительный результат. Тогда поступают следующим образом: после особо тщательного обжигания пробки и горлышка пробирки в случае хранения на агаризованных средах содержимое переносят пинцетом или путем встряхивания на новую

агаризованную питательную среду в другую пробирку. Среда должна быть свежеприготовленной и содержать немного пептона, а из сахаров — по возможности мальтозу (мальц-экстракт, солодовый экстракт, пивное сусло) [314]. Если культуры хранились в почве, песке, на зерне, то содержимое пробирки высыпают в несколько пробирок или чашек Петри со свежей средой так, чтобы была покрыта вся поверхность. Если высушивали или замораживали суспензии спор, то ресуспендированную культуру рассеивают в несколько пробирок или колб с твердой или жидкой питательной средой. Культуру помещают в термостат с оптимальной для роста температурой. Наблюдения показывают, что в случае хранения на агаризованных или твердых естественных средах в этих условиях оживает грибница, находящаяся в глубоких слоях субстрата.

Помимо метода «оживления» культур некоторые исследователи предприняли попытку восстановить признаки, утраченные в процессе хранения грибов. Спорообразование, например, восстанавливается после нескольких последовательных пересевов на свежие питательные среды в случае хранения культуры под вазелиновым маслом, а в других случаях после смены питательной среды при последовательных перeseвах. Потерю некоторых признаков можно предотвратить, подкисляя питательную среду или выращивая исследуемую культуру совместно с другими микроорганизмами [423]. Так, у ряда сумчатых грибов спороношение восстанавливается при совместном выращивании с другими грибами в чашках Петри [35]. Утрату способности образовывать склероции при хранении можно замедлить, закладывая на хранение грибы, выращенные из одного склероция. Способность образовывать склероции восстанавливается при подкислении питательной среды до pH 2,85—3,5, совместном выращивании с другими грибами, добавление в среду экстрактов из мицелия некоторых актиномицетов и грибов [241].

Ни один из способов длительного хранения не гарантирует культуры от изменчивости, поэтому необходимо постоянно вести отбор типичных форм.

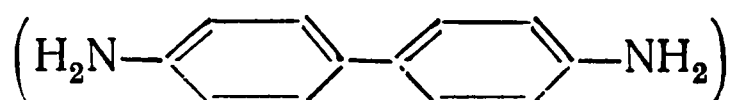
ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 (см. раздел I.3.2.). Основные реактивы, применяемые в химических цветовых реакциях при изучении Basidiomycetes.

Аммиак (NH_3): газообразный и 25%-ный водный раствор (NH_4OH). При положительной реакции ткань карпофора и пластинок становится розовой, оливковой, желтоватой, фиолетовой, зеленоватой, пурпурно-красной, серовато-черной.

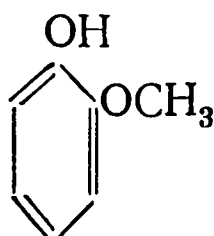
Анилин ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$): чистый анилин или смешанный с равным количеством дистиллированной воды. При положительной реакции ткань карпофора становится красноватой, медно-красной, желтоватой, золотисто-желтой, темно-коричневой.

Бензидин



96%-ный спиртовой раствор. При положительной реакции ткань карпофора окрашивается в голубой цвет, что свидетельствует о наличии лакказы.

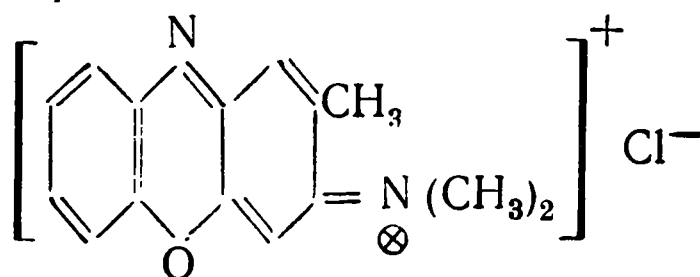
Гваякол (1-гидрокси-2-метоксибензол)



настойка 1 г зерен *Guajacum officinale* L. или *G. sanctum* L. в 5 мл 96%-ного этанола. При положительной реакции наблюдается голубовато-зеленоватое, желтоватое, зеленоватое, красновато-коричневатое окрашивание карпофора.

Кислоты: 60—70%-ная серная (H_2SO_4), 65%-ная азотная (HNO_3), 24%-ная соляная (HCl), концентрированная молочная ($\text{CH}_3\text{—CH(OH)—COOH}$). При положительной реакции ткань карпофора и пластинок окрашивается в лиловый, коричневый, красный, черно-коричневый, желтовато-красный цвета. Реакции с кислотами проводят на свежем грибном материале.

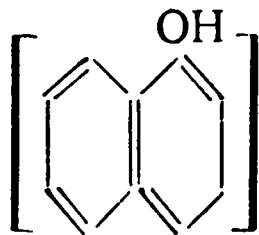
Крезил синий (7-амино-2-диметиламино-3-метилфеноксазонилхлорид): водный раствор зеленовато-синего цвета



Применяется для определения метахроматии структур. Структура называется метахроматичной, если водным раствором крезила синего окрашивается в красновато-фиолетовый (но не синий) цвет.

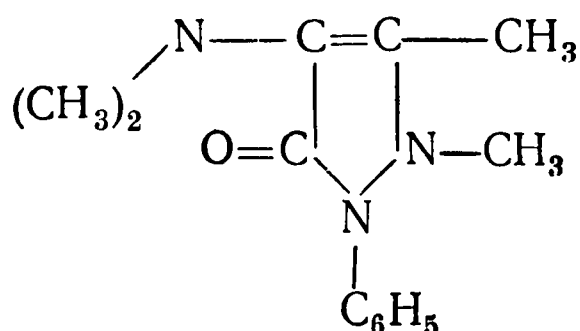
Лактофенол: смесь равных частей молочной кислоты и фенола. При положительной реакции наблюдается серовато-коричневое, розовато-фиолетовое, лилово-серое, пурпурно-коричневое, красновато-коричневое окрашивание карпофора и мякоти.

α-Нафтол



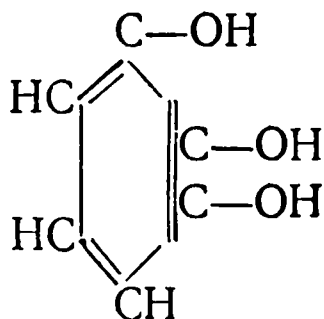
смесь нескольких капель α-нафтола, 2 мл 90%-ного этанола и 4 мл дистиллированной воды. При положительной реакции ткань карпофора через 2—4 мин окрашивается в серый, фиолетовый, голубой, коричневый, шоколадно-коричневый цвета. Пластинки видов родов *Agaricus* и *Gyrophragmium* окрашиваются в красноватый цвет.

Пирамидон (2,3-диметил-4-диметиламинопиразолон-(5): водный раствор



При положительной реакции ткань карпофора окрашивается в сиреневато-фиолетовый цвет.

Пирогаллол (1,2,3-тригидроксибензол): раствор пирогаллола в 96%-ном этаноле



При положительной реакции наблюдается окрашивание карпофора в темно-коричневый, коричневато-оранжевый цвета.

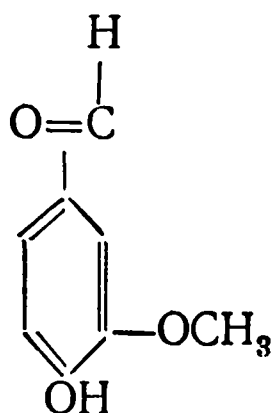
Реактив Мельцера: раствор 0,5 г кристаллического йода и 1,5 г KI в 20 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 20 мл хлоралгидрата ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). С помощью этого реактива определяют амилоидность спор, базидий, гиф, тканей. Структуры называются амилоидными, если окрашиваются реактивом Мельцера в голубой, фиолетовый, иногда почти черный цвета. Структуры, которые не окрашиваются реактивом Мельцера или слегка желтеют, называются неамилоидными. Структуры, окрашиваемые реактивом Мельцера в винно-красный или пурпурный цвет, называются декстриноидными (псевдоамилоидность). По данным Р. Зингера [777], амилоидность проявляется у образцов, сотни лет пролежавших в гербарии.

Реактив Шеффера: анилин и 65%-ная азотная кислота (перекрестная реакция). По поверхности карпофора видов рода *Agaricus* стеклянной палочкой проводят полоску анилином, другой стеклянной

палочкой проводят пересекающуюся с ней полоску азотной кислотой. При положительной реакции в месте пересечения появляется хромово-желтое, позднее оранжево-красное окрашивание. Реакцию Шеффера можно проводить и на материале, длительное время пролежавшем в гербарии.

Сульфат железа (FeSO_4): раствор 1 г сульфата железа в 10 мл дистиллированной воды с добавлением 2—3 капель серной кислоты. При положительной реакции ткань карпофора окрашивается в серовато-коричневый, серовато-зеленоватый, зеленый, желтоватый, оранжевый, красноватый цвета.

Сульфованилин



Раствор 1 г химически чистого ванилина (3-метокси-4-гидроксibenзальдегид) в смеси с 8 мл концентрированной серной кислоты и 3 мл дистиллированной воды. Получаемый раствор желтоватого цвета используют для реакции со свежим материалом. При положительной реакции ткань карпофора окрашивается в пурпурно-розовый, коричневато-серый, розовато-фиолетовый, коричневый, фиолетово-черный, грязно-пурпурный цвета.

Сульфоформалин: смесь равных частей формалина и 60-70%-ной серной кислоты. Бесцветный раствор сульфоформалина используют для реакций со свежим материалом и материалом, сохранившимся в формалине не более 6 мес. При положительной реакции карпофор окрашивается в коричневатый, зеленовато-коричневый, голубовато-зеленоватый или желтоватый цвета.

Фенол ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$): 2—3%-ный водный раствор фенола (карболовая кислота). При положительной реакции через 20 мин карпофор приобретает шоладно-коричневую, пурпурно-фиолетовую, винно-красную, розовую, зеленовато-голубоватую окраску. Если в течение 20 мин окраска карпофора не изменяется, реакция считается отрицательной (даже если в дальнейшем окраска изменяется).

Феноланилин: смесь 3 капель анилина, 5 капель концентрированной серной кислоты и 10 мл 2—3%-ного водного раствора фенола. При положительной реакции ткань карпофора и гименофора окрашивается в ржаво-розовый, лилово-розовый, красноватый, пурпурно-розовый, затем шоладно-коричневый цвета.

Формалин: 40%-ный водный раствор формальдегида (HCHO). При положительной реакции ткань карпофора и гименофора окрашивается в розовый, оранжево-красный, фиолетово-коричневый цвета.

Хлорид железа (FeCl_3): 10%-ный водный раствор. При положительной реакции ткань карпофора окрашивается в оливковый, оливково-черный, зеленоватый цвета.

Щелочи: 40%-ные растворы едкого натра (NaOH) и едкого кали (KOH). При положительной реакции ткань карпофора окрашивается в оранжевый, охристый, желтый, коричневый, красный, оранжево-красный, оливково-зеленый, серый, черный цвета.

Приложение 2 (см. раздел II.1.5.3.). Перечень красителей, применяемых при микроскопическом изучении грибов

Анилиновый синий: 0,5—1%-ный спиртовой или молочнокислотный раствор. Хорошо дифференцирует в живом виде мицелий и конидиеносцы пероноспоровых, мицелий несовершенных грибов; при этом четко выделяются особенности строения оболочки, поперечные перегородки и т. д. Время окрашивания — от нескольких секунд до 30 мин. Мицелий мучнисторосяных лучше окрашивать спиртовыми растворами. Ржавчинные грибы почти не окрашиваются. Широко применяется смесь анилинового синего (0,1 г), молочной кислоты (50,0 г) и дистиллированной воды (100,0 г). Материал промывают и помещают в каплю молочной кислоты. Хорошо дифференцируются мицелий и гаустории ржавчинных и пероноспоровых грибов. Время окрашивания — 5 мин, лучше при слабом нагревании.

Хлопчатобумажный синий 4 В или У 4 В: 1%-ный водный или молочнокислотный раствор. Окрашивает мицелий и конидиеносцы пероноспоровых, а также внутриклеточных паразитов. Время окрашивания 30 с — 10 мин.

Водный синий: 1%-ный водный раствор. Хорошо дифференцирует мицелий большинства видов грибов, ржавчинных, особенно четко окрашивает молодые сумки и парафизы сумчатых. Мучнисторосяные почти не окрашиваются. Время окрашивания 30 с — 1 мин.

Генциановый фиолетовый: 1%-ный водный раствор. Окрашивает мицелий и спороношения пероноспоровых, несовершенных, сумчатых и других грибов. Время окрашивания 1—30 мин.

Метиленовый синий: 1%-ный водный раствор или в сочетании с глицерином. Хорошо дифференцирует мицелий мучнисторосяных, многих базидиальных; окрашивает несовершенные грибы. Время окрашивания от нескольких секунд до нескольких минут.

Тионин: в чистом виде, лучше в смеси с другими красителями. Красящий раствор готовят следующим образом: 0,1 г тионина растворяют в 3—5%-ном растворе фенола в дистиллированной воде. Окрашивает мицелий мучнисторосяных и базидиальных грибов в тканях растений; мицелий окрашивается в темно-фиолетово-пурпурный цвет, а флоэма и неодревесневшие ткани растений — в ярко-фиолетовый. Время окрашивания 1—20 мин.

Приложение 3 (см. раздел III.4.). Характеристика наиболее распространенных лабораторных установок для ферментации аэробных микроорганизмов ([239] с дополнением)

Показатель	Единицы измерения	Фирма «Марушиби», Япония	Фирма «Хемап», Швейцария	Проточный культиватор Чехословацкой АН	АНКУМ-1 СКБ ВП АН СССР	АНКУМ-2* СКБ ВП АН СССР
Емкость ферментера	л	до 10	5—8	0,5—1,5	1	1—1,5
Количество ферментеров в установке	—	5	1	3	6	1
Способ перемешивания		Механический	Механический	Механический	Механический	Механический
Скорость вращения мешалки	об/мин	200—800	300—1500	200—1400	200—2000	50—1500
Способ пеногашения	—	Химический	Химический	Механический и химический	Механический	Механический
Способ подачи питательной среды	—	Электромагнитный клапан	Перистальтический насос	Клавишный насос	Пневмодозатор	Пневмодозатор
Диапазон аэрации среды	л/мин	1—10	—	0,2—2,5	0,2—5	0,1—6,5
Диапазон основных параметров контроля среды						

концентрация водородных ионов	ед. рН	—	—	—	3—8±0,15	4—9
температура	К	273—343	—	293—323	293—328	293—328
оптическая плотность	ед. оптической плотности	—	—	—	0,2—1,8	0—2
Регулирование температуры	—	Автоматическое позиционное	Автоматическое позиционное	Позиционное (±0,5 К)	Позиционное (±0,5 К)	Позиционное
Регулирование рН	—	Автоматическое позиционное	Автоматическое позиционное	Позиционное	Позиционное	Позиционное
Количество параметров регистрации	—	3	2	—	6	6
Способ регистрации	—	Самописец на ленте, непрерывный	Самописец на ленте, непрерывный	—	Прибор ЭПП-0,9, периодический	КСП-4
Габаритные размеры	мм	500×650×1450	2200×900×1500	1300×1000×2005	5100×750×1800	2000×760×1850
Общая масса установки	кг				750	

* Кроме АНКУМ-2 выпускается АНКУМ-10 с общей емкостью ферментера 10 л, полезной емкостью — 2—6,5 л и диапазоном аэрации 10,5 л/мин.

Приложение 4 (см. раздел III.4.3.). Рекомендации по единому обозначению процесса непрерывного культивирования

На Втором симпозиуме по непрерывному культивированию микроорганизмов (Прага, июнь 1962 г.) были приняты рекомендации по единому обозначению процессов роста:

Обозначение величины	Размерность	
V, v	L^3	— объем
F, f		— скорость потока
D	t^{-1}	— скорость разбавления
S, s	ML^{-3}	— концентрация лимитирующего субстрата
Z, z	ML^{-3}	— концентрация не лимитирующего субстрата
X, x	ML^{-3}	— концентрация биомассы
N, n	L^{-3}	— число микроорганизмов в единице объема
μ	t^{-1}	— удельная скорость роста
$\mu_{\max}$	t^{-1}	— максимальная удельная скорость роста (коэффициент физиологической активности)
q	$\frac{ds}{dt} \frac{1}{x}^{(x)}$	— коэффициент метаболизма
K		— остальные константы скорости роста
$y = \frac{dx^{(x)}}{ds}$		— экономический коэффициент (выход биомассы)
$\alpha = \frac{dp^{(x)}}{ds}$		— выход продукта
P, p	ML^{-3}	— концентрация продукта
t	t	— время
g	t	— время удвоения биомассы
Θ	t	— время оборота 1/Д
$K_s K_z$		— константа Михаэлиса — Ментен для субстрата
a		— отношение объема возвращаемой среды к основному притоку
a'		— отношение возврата среды к притоку
b		— отношение возврата биомассы

Надписи и подписи:

$\lambda, \max$	— для обозначения максимальных величин
1, 2, 3, ..., w	— для обозначения величин, относящихся к 1, 2, 3, ... степени
O	— для обозначения начальных величин
T	— для обозначения параметров трубчатого ферментера
A, B, C, ...	— для обозначения всех величин, относящихся к мутантам или другим видам микроорганизмов

Приложение 5 (см. раздел VI.2.). Основные рабочие и буферные растворы, используемые для разделения белков (рН 8,9; 7%-ный раствор геля) [418]

О с н о в н ы е р а с т в о р ы_щ

Раствор А _щ [*]		Раствор Б _щ [*]	
1 н. НСl	48,0 мл	1 н. НСl	48,0 мл
Трис	36,60 г	Трис	5,98 г
ТЕМЭД	0,23 мл	ТЕМЭД	0,46 мл
ДМ	До 100,0 мл	ДМ	До 100,0 мл
рН 8,9		рН 6,7	
Раствор В _щ		Раствор Г _щ	
Акриламид	28,0 г	Акриламид	10,0 г
БИС	0,735 г	БИС	2,5 г
ДМ	До 100,0 мл	ДМ	До 100,0 мл
Раствор Д _щ		Раствор Е _щ	
Рибофлавин	4,0 мг	Сахароза	40,0 г
ДМ	До 100,0 мл	ДМ	До 100,0 мл
* рН раствора устанавливают 1 н. НСl.			
Растворы можно хранить до 4 мес. при 4° С.			

Р а б о ч и е р а с т в о р ы_щ

Смесь 1 _щ		Раствор 2 _щ	
для приготовления мелкопористого геля			
1 объем раствора А _щ		Персульфат	
2 объема раствора В _щ		аммония	0,14 г
1 объем ДМ		ДМ	До 100,0 мл
рН 8,9			
Сначала готовят смесь 1 _щ , затем добавляют к ней равный объем раствора 2 _щ (раствор крупнопористого геля _щ).			
для приготовления крупнопористого геля			
1 объем раствора Б _щ			
2 объема раствора Г _щ			
1 объем раствора Д _щ			
4 объема раствора Е _щ			
рН 6,7			
Основной раствор _щ для приготовления электродного буфера			
		Краситель	
Трис	6,0 г	Бромфеноловый синий	0,001 г
Глицин	28,8 г	ДМ	До 100,0 мл
ДМ	До 100,0 мл		
рН 8,3			
Перед употреблением разбавляют в 10 раз!			
Красящий раствор-фиксатор		Консервирующий раствор-дифференциатор	
Амидочерный 10-В 1,0 г		7%-ная уксусная кислота	
(доводится до 100 мл 7%-ной уксусной кислоты)			

Основные и рабочие растворы_к (рН 4,3; 15%-ный раствор геля)

Основные растворы_к

Раствор А_к

1 н. КОН	48,0 мл
Ледяная уксусная кислота	17,2 мл
ТЕМЭД	4,0 мл
ДМ	До 100,0 мл

Раствор В_к

Акриламид	60,0 мг
БИС	0,4 г
ДМ	До 100,0 мл

Раствор Д_к

Рибофлавин	4,0 мг
ДМ	До 100,0 мл

Раствор Б_к

1 н. КОН	48,0
Ледяная уксусная кислота	2,87 мл
ТЕМЭД	0,46 мл
ДМ	До 100,0 мл

Раствор Г_к

Акриламид	10,0 г
БИС	2,5 г
ДМ	До 100,0 мл

Раствор Е_к

Сахароза	40,0 г
ДМ	До 100,0 мл

Рабочие растворы_к для приготовления мелкопористого геля

Смесь 1_к

1 объем раствора А_к

2 объема раствора В_к

1 объем ДМ

рН 4,3

Сначала готовят смесь 1_к, затем к ней добавляют равный объем раствора 2_к.

Раствор 2_к

Персульфат аммония 0,28 г

ДМ До 100,0 мл

Рабочие растворы для приготовления крупнопористого геля

1 объем раствора Б_к

2 объема раствора Г_к

1 объем раствора Д_к

4 объема раствора Е_к

рН 6,8

1 объем раствора Б_к

2 объема раствора Г_к

1 объем раствора Д_к

4 объема ДМ

Основной раствор_к для приготовления электродного буфера_к

β-Аланин 31,2 г

Ледяная уксусная кислота 8,0 мл

ДМ До 1 л

рН 4,5

Перед употреблением разбавляют в 10 раз!

Краситель_к

Метиленовый зеленый 0,1 г

ДМ До 100,0 мл

Красящий раствор-фиксатор и консервирующий раствор-дифференциатор готовят по рецептуре, указанной для щелочной буферной системы.

Приложение 6 (см. раздел IX.10.). Характерные качественные химические реакции антибиотиков, продуцируемых пенициллами и аспергиллами

<i>Альбидин</i>	С концентрированными кислотами окрашивается: с серной — в зеленый, азотной — в оранжевый, соляной — в красный цвета; в щелочной среде — в коричневый, кислой — в светло-коричневый цвета.
<i>Аспергилловая кислота</i>	В спиртовом растворе хлорного железа окрашивается в красный цвет, с медным купоросом — в зеленый; с азотнокислым серебром дает кристаллический осадок.
<i>Виридикатин</i>	В нейтральном водном растворе хлорного железа окрашивается в интенсивный зеленый цвет; в присутствии диазотированной сульфаниловой кислоты — в темно-красный.
<i>Гельволевая кислота</i>	С хлорным железом дает желтый осадок; в растворе Либермана — Бурхардта окрашивается в интенсивный красный цвет, в растворе Циммермана — в оранжевый, с тетранитрометаном окрашивается в желтый цвет.
<i>Геодин</i>	В спиртовом растворе хлорного железа окрашивается в зеленый цвет (до коричневого оттенка); с нейтральными солями натрия дает коричнево-серый осадок.
<i>Гладиоловая кислота</i>	Отрицательные реакции с хлорным железом, реактивами Фелинга, Шиффа; в растворе аммиака окрашивается в интенсивный зеленый цвет.
<i>Глиотоксин</i>	Обесцвечивает перманганат калия в щелочном растворе; окрашивается в зеленый цвет.
<i>Гризеофульвин</i>	Отрицательные реакции с хлорным железом, бромистым водородом, пиридином, щелочным раствором нитропруссиды; окрашивается в желтый цвет в присутствии серной или азотной кислоты.
<i>Гентизиловый спирт</i>	Обесцвечивает перманганат калия; изменяет голубую окраску водного раствора хлорного железа в желтую и желтую окраску едкого натра в красно-коричневую.
<i>Канесцин</i>	С хлорным железом приобретает пурпурную окраску, в холодном растворе NaHCO_3 дает красную, затем оранжевую окраску; отрицательная реакция с реактивом Фелинга.
<i>Койевая кислота</i>	С хлорным железом окрашивается в красный цвет; восстанавливает реактив Фелинга.
<i>Микофеноловая кислота</i>	Отрицательные реакции с реактивом Фелинга и аммиачным серебром; с хлорным железом приобретает интенсивный голубой цвет.
<i>Мицелинамид</i>	В разбавленном спиртовом растворе хлорного железа или в ледяной уксусной кислоте окрашивается в красно-коричневый цвет; в холодном разбавленном растворе едкого натра пенится и темнеет, распространяя лавандоподобный запах.

<i>Нотатин</i>	С уксусной кислотой приобретает зеленую флюоресцирующую окраску.
<i>Патулин</i>	Отрицательные реакции с хлорным железом, реактивом Шиффа; со щелочью окрашивается в красный цвет, с разбавленным аммонием, пипередином, аспарагином, аминокислотами — в желтый; восстанавливает аммиачный раствор азотнокислого серебра, реактив Фелинга, перманганат калия; образует желтые кристаллы с 2,4-динитрофенилгидразином.
<i>Пеницилловая кислота</i>	При подогреве с хлорным железом окрашивается в оранжево-коричневый цвет; в растворе аммония — в красновато-пурпурный.
<i>Пуберуловая кислота</i>	В разбавленном растворе хлорного железа окрашивается в желто-коричневый цвет, в пересыщенном растворе хлорного железа — от аметистового до красно-коричневого.
<i>Пуберулоновая кислота</i>	Реакция с хлорным железом такая же, как у пуберуловой кислоты.
<i>Ругулозин</i>	В хлороформе и ледяной уксусной кислоте приобретает желтый цвет со слабой зеленой флюоресценцией, в спиртовом растворе хлорного железа — оливково-коричневый; отрицательные реакции с реактивами Брэди и Шиффа.
<i>Спинулозин</i>	В спиртовом растворе хлорного железа окрашивается в интенсивный коричневый цвет, в концентрированной серной кислоте — в синий, в нормальном растворе едкого натра — в красный.
<i>Тардин</i>	С хлорным железом окрашивается в пурпурный цвет, который при нагревании изменяется в коричневый.
<i>Террецин</i>	С хлорным железом окрашивается в темно-фиолетовый цвет.
<i>Терреева кислота</i>	С хлорным железом окрашивается в темно-красный цвет; восстанавливает реактив Фелинга и аммиачный раствор азотнокислого серебра.
<i>Феницин</i>	Имеет желтую, красную, фиолетовую окраску в зависимости от pH; в спиртовом растворе хлорного железа окрашивается в интенсивный фиолетовый цвет.
<i>Фреквентин</i>	В спиртовом и водном растворах хлорного железа окрашивается в пурпурный цвет; восстанавливает аммиачную окись серебра; дает положительную реакцию с реактивом Шиффа.
<i>Фумигатин</i>	В растворе хлорного железа в абсолютном спирте окрашивается в интенсивный пурпурно-черный цвет; изменяет коричневую окраску в вишнево-красную через 2 мин после добавления в холодную концентрированную серную кислоту.
<i>Цефалоспорин С</i>	В растворе плюмбита натрия в 50%-ном едком натре образует черный осадок.

<i>Цефалоспорин Р</i>	В растворе тетранитрометана в хлороформе окрашивается в желтый цвет; дает положительные реакции с реактивами Либермана — Бурхардта и Сальковского.
<i>Циклопалдиевая кислота</i>	В водном и спиртовом растворах хлорного железа окрашивается в красный цвет; даёт отрицательную реакцию с реактивом Фелинга; в бромной воде окрашивается в телесный цвет.
<i>Цитринин</i>	С хлорным железом окрашивается в синий цвет, в водном растворе едкого натра — в оранжево-желтый, в водном растворе при рН 4,6 — в лимонный, при рН ниже 5,6—5,8 — в оранжево-розовый, при рН выше 9,9 — в красный; положительная реакция с реактивом Траубера.
<i>Цитромицетин</i>	С хлорным железом окрашивается в зеленый цвет, с концентрированной серной кислотой — в оранжевый с зеленой флюоресценцией.
<i>Эрквеин</i>	В водном растворе при добавлении щелочи приобретает желтый цвет с бутыльно-зеленой флюоресценцией.

Приложение 7 (см. раздел XVII.6.). Основные питательные среды для культивирования патогенных грибов

Медовая среда Сабуро (г): 40—80 меда; 10 пептона; 18 агара; 1000 мл воды. Способ приготовления такой же, как оригинальной среды Сабуро.

Среда Городковой: МПА с добавлением 0,25% глюкозы. Стерилизуют при 110°С 15 мин.

Среды из органов животных и человека: кусочки органов (печень, селезенка, мозговая ткань, сердце, почки и др.), взятые от свежего трупа здоровых животных, измельчают в мясорубке или ступке и взвешивают; к одной части измельченной ткани органа добавляют 2 части воды, протирают через сито и варят в течение 2 ч в аппарате Коха (100°С). На следующий день добавляют 2% агара, кипятят в течение 30 мин, фильтруют через марлю и вату и разливают в пробирки. Стерилизуют при 110°С 20 мин.

Кукурузная среда: смесь 45 г кукурузной муки в 1000 мл воды подогревают в течение часа при 60°С на водяной бане, добавляют 15 г агара и кипятят до растворения, затем фильтруют через марлю и вату, разливают в пробирки. Стерилизуют при 120°С 30 мин.

Дрожжевая вода: 80 г прессованных или 20 г сухих пивных или пекарских дрожжей кипятят 15—20 мин в 1000 мл воды, фильтруют после охлаждения через бумажный фильтр, разливают в пробирки и колбы. Стерилизуют при 120°С 15 мин.

Среда Курунга: 1 г картофельного крахмала; 100 мл дистиллированной воды; 150 мл яичной смеси. Применяют для хранения патогенных форм грибов. Воду с крахмалом прогревают на горелке до сгущения смеси, автоклавируют при 115°С 15 мин. Яичную смесь из 100 мл желтков и 50 мл цельных яиц встряхивают со стеклянными шариками и добавляют к стерильному картофельному крахмалу; разливают по стерильным пробиркам и оставляют в наклонном положении в течение часа при 90°С для свертывания. Яйца берут свежие с объемом содержимого 50 мл, из которых 15 мл приходится на желток [149, 199, 201, 401].

Приложение 8 (см. раздел XVIII.9.). Основные питательные среды для культивирования фитопатогенных грибов

Ломтики картофеля: промытые и очищенные от кожицы клубни картофеля нарезают на кубики и помещают в пробирки, стерилизуют текущим паром в течение 3 дней.

Зерно риса: 2 г риса + 6 мл воды помещают в пробирку стерилизуют таким же образом, как и предыдущую среду.

Стебли люпина: кусочки стебля + 3—6 мл воды помещают в пробирку, стерилизуют при давлении 1 атм 30 мин.

Семена конопли: разрезанные на две половинки семена помещают в воду, стерилизуют текущим паром 3 дня; наиболее распространенная среда для культивирования.

Агар на отваре из овсяной муки: 100 г муки кипятят в 1 л воды на водяной бане в течение часа при 60° С, фильтруют, добавляют 3% агара, стерилизуют при 1 атм.

Агар на отваре из кукурузной муки: 20 г кукурузной муки кипятят в 1 л воды в течение 1 ч, фильтруют, добавляют 20 г агара, стерилизуют при давлении 0,5 атм 15 мин. Добавляя к среде 20 г глюкозы и 20 г пептона, можно усилить рост мицелия. В среде без добавок преобладает спороношение.

Солодовый агар: 20—50 г концентрата ячменного сусла и 20 г агара растворяют в 1 л воды; стерилизуют при 0,5 атм 15 мин.

Яблочный агар: 200 г протертых яблок кипятят в 1 л воды, отфильтровывают, добавляют 2—3% агара.

Среды из отваров разных субстратов можно готовить на основе минеральной части среды Чапека.

Среды для культивирования облигатных фитопатогенных грибов. Срезанные листья или их отрезки в растворах кинетина (10 мг/л) или бензимидазола (40 мг/л) длительное время могут сохраняться в нормальном состоянии, реагировать на заражение паразитными грибами, причем особенности проявления заболевания аналогичны с наблюдаемыми при испытании на целом растении. Отрезки листьев проростков пшеницы помещают на поверхность раствора в чашки Петри, заражают напылением смеси уредоспор с тальком на поверхность листьев и выдерживают в камере при температуре 10—12° С и 18-часовом периоде освещения. На проростках пшеницы спороношение, например, *Russinia striiformis* f. *tritici* наступает через 10—14 дней; на листьях ячменя спороношение *Erysiphe graminis* f. *hordei* — на 7-й день; на листьях винограда этим способом получают спороношение *Plasmopara viticola* [210].

*Пептонно-глюкозная среда с добавлением бенгальского розового и стрептомицина для выделения из почвы видов *Pythium* (г):* 1 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄; 5 пептона; 10 глюкозы; 20 агара; 1 л дистиллированной воды; 30 мг стрептомицина или 2 мг ауреомицина. К каждому литру среды добавляют 10 мл раствора бенгальского розового (1 : 300). После стерилизации при давлении 1 атм в течение 30 мин и охлаждения до 45—60° С добавляют антибиотики. Среда ограничивает развитие быстрорастущих грибов и подавляет рост бактерий и актиномицетов.

*Среда для культивирования *Phytophthora infestans* (мг):* 40 г K₂HPO₄; 20 NaNO₃; 15 CaCl₂; 15 MgCO₃; 10 Na₂SO₄; 2 FeSO₄; 20 янтарной кислоты; 60 D- или D_L-аспарагиновой кислоты; 40 L-глутаминовой кислоты; 20 аланина; 20 глицина, 10 HCl-цистеина; 5—10 г тиамина; 1,5 г сахарозы; 1 л дистиллированной воды. Стерилизуют при давлении 0,25 атм 30 мин. Начальное значение pH 5—5,2. Твердую среду получают, до-

бавляя 1,5—2% агара. Для усиления роста можно добавить измельченные кусочки клубней картофеля или экстракт из семян ржи, который готовят автоклавированием 100 г семян ржи в 1 л воды при 2 атм в течение 30—40 мин.

Факультативные виды фитопатогенных грибов культивируют на среде Чапека или Ролен — Тома.

Среда Леониана (г): 1,25 K_2HPO_4 ; 0,625 $MgSO_4$; 0,625 пептона; 6,25 мальтозы; 6,25 солодовой вытяжки; 20 агара; 1 л дистиллированной воды. Применяют для исследования плодоношения грибов и формирования плодовых тел. Рекомендуются для грибов, образующих перитеции или пикниды.

Среда Чапека с 1%-ным дрожжевым экстрактом. Дрожжевой экстракт готовят следующим способом: суспензию из 100 г обычных хлебопекарских дрожжей в 400 мл воды автоклавируют при давлении 2 атм 30 мин. После осаждения надосадочную жидкость добавляют к среде Чапека. Применяют для культивирования видов *Pythium*, *Phytophthora* и других фитопатогенных грибов; *Colletotrichum lindemuthianum* на этой среде обильно спороносит.

Среда для изоляции Phytophthora infestans из корней (мкг/мл): 20 г кукурузной муки; 100 пимарицина; 100 нистатина; 50 пенициллина; 50 полимиксина.

Среда для образования спороншения Phytophthora parasitica: 20 г порошка древесного угля; 1 л воды.

Среда для получения перитециев у Drechslera (г): 6 сахарозы; 2,7 пролина; 1,3 K_2PO_4 ; 0,5 KCl ; 0,5 $MgSO_4$; 10 мг $FeSO_4$; 2 мг $ZnSO_4$; 1,6 мг $MnCl_2$; 20 агара; 1 л воды.

Среда для культивирования Puccinia graminis f. tritici: к среде Чапека с сахарозой добавляют 0,1% дрожжевого экстракта, 0,1 пептона, 1% бакто-агара Дифко, автоклавируют при 121° С.

Среда для изоляции Graphium (конидиальной стадии *Ceratocystis ulmi*): 200—300 мкг/мл циклогексимида и 10 мкг/мл стрептомицина добавляют в картофельно-декстрозный агар.

Селективная среда для разделения видов Verticillium: 50 г высушенных слив, разрезанных на кусочки, кипятят в 1 л воды 30 мин и отделяют жидкость от мякоти, протирая через фильтр. На 100 г такого экстракта добавляют 5 г лактозы, 1 г дрожжевого экстракта Дифко и 30 г агара, доводят до 1 л дистиллированной водой (рН 5,8—6,0). Среду разливают в чашки Петри. По характеру роста обратной стороны колонии определяют следующие виды: *V. dahliae* — структура колоний узловатая и гранулированная в результате развития черных микросклероциев; *V. albo-atrum* — темноокрашенные гифы образуют отдельные радиальные структуры; *V. tricorpus* — образуются хламидоспоры, обратная сторона может быть радиальной и гранулированной.

Приложение 9 (см. раздел XIX.2.6.). Основные питательные среды для культивирования морских грибов

Среда GY (%): 0,1 глюкозы; 0,01 дрожжевого экстракта Дифко; 1,8 агара на 1 л морской воды. Иногда указанные выше компоненты входят в состав среды в иных количествах (%): 0,5 глюкозы; 0,1 дрожжевого экстракта; 1,8 агара или 1,0 глюкозы; 0,1 дрожжевого экстракта; 1,5 агара [703, 817]. Селективность этой среды для выделения грибов, особенно растущих на погруженных панелях древесины, значительно увеличивается, если соленость морской воды, используемой для приго-

товления среды, составляет приблизительно 20‰ и если к среде добавляют 0,03% стрептомицина. Стрептомицин в указанной концентрации действует как прекрасный ингибитор роста морских бактерий, часто загрязняющих культуры медленно растущих морских сумчатых и несовершенных грибов. В то же время он не подавляет развития этих грибов.

Для культивирования морских грибов используют также универсальные среды: картофельно-декстрозный агар (КДА), декстрозо-пептонный агар, среду Чапека, обедненный агар Сабуро и др. [8] и различные среды неопределенного состава: голодный агар с морской водой; среду, в состав которой сходят 1,5% мальц-экстракта на 1 л морской воды; среду TG [576, 578]: 10,0 г глюкозы и 3,0 г триптона на 1 л морской воды.

Среда Вишняк в модификации Анастасиу и Черчленда [493] (г): 0,02 экстракта печени; 1,0 глюкозы; 0,2 дрожжевого экстракта; 0,1 различных аминокислот из казеина; 15,0 агара на 1 л профильтрованной стерильной морской воды. Для подавления бактериального загрязнения при культивировании грибов к этой среде после стерилизации добавляют до 500 тыс. ед. пенициллина и 0,5 г стрептомицина.

Среда Тубаки [818] (г): 30,0 глюкозы; 1,0 пептона; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 K_2HPO_4 ; 0,5 дрожжевого экстракта; 15,0 агара. Доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 л. В качестве источника хлора к основной среде поочередно добавляют NaCl, KCl и MgCl_2 , а также смесь этих солей (2—7%).

Среда MS-1 (модифицированная среда Чапека — Докса) [636] (г): 3,0 NaNO_3 ; 1,0 K_2HPO_4 ; 0,001 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 KCl; 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10,0 глюкозы на 1 л выдержанной отфильтрованной естественной морской воды.

Среда MS-2 Густафсона и Фриза, незначительно модифицированная Джонсоном с сотр. [636] (г): 1,0 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 2,5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1,0 KH_2PO_4 ; 0,1 CaCl_2 ; 5,5 мг $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 5,5 мг $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 4 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,5 мг лимоннокислого железа; 5 мг лимонной кислоты; 1,0 L-аспарагина; 10,0 глюкозы на 1 л отфильтрованной морской воды.

Среда MS-4 (г): 25,0 NaCl; 10 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 5,0 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 2,5 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,7 KCl; 0,2 NaHCO_3 ; 0,003 H_3BO_3 ; 0,001 $\text{FePO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 KBr; 0,05 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,005 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 0,005 NaF; 0,002 NH_4NO_3 ; 10 глюкозы на 1 л дистиллированной воды. Для получения агаризованной среды MS-4 добавляют 1,8% агара [636, 679].

Модифицированная среда MS-4 [637] (%): 2,0 NaCl; 0,5 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 K_3PO_4 ; 0,02 NH_4NO_3 ; 0,05 $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,01 $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,06 KCl; 0,02 NaHCO_3 ; 0,01 KBr; 0,003 NaF; 0,004 $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и 1 мл раствора микроэлементов следующего состава (мг): 0,5 натриевой соли ЭДТА; 2,5 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,05 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,02 H_3BO_3 . Все компоненты среды растворяют в 999 мл дистиллированной воды и таким образом составляют искусственную морскую воду. Для получения твердой среды добавляют 1,8% агара. В качестве источника углерода используют 0,5% глюкозы.

Приложение 10 (см. раздел XIX.3.). Основные питательные среды для получения плодовых тел (I) и мицелия (II) высших базидиомицетов в культуре

I. Среда Планкета [740] (г):

сахароза	}	разные количества
аспарагин		
MgSO ₄ · 7H ₂ O		2,5
KH ₂ PO ₄		5
FeSO ₄ · 7H ₂ O		следы
вода дистиллированная		1 л

Среда Маделина [683] (г):

глюкоза	1	дрожжевой экстракт	3
KH ₂ PO ₄	2	вода	1 л
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	агар	20

Среда Коха [651] (мг):

глюкоза	50 г	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4,4
D-аланин	0,5 г	CaCl ₂	40
KH ₂ PO ₄	1,0 г	витамин B ₁	0,03
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 г	вода дистиллированная	1 л
FeCl ₃	4,8	агар	15 г
MnCl ₂	9,9		

Среда Сугимори и др. [785] (мг):

этанол	20 мл	тиамин	0,03
дрожжевой экстракт	1—3 г	фолиевая кислота	0,3
KH ₂ PO ₄	0,3 г	никотиновая кислота	0,3
FeSO ₄	3	вода дистиллированная	1 л
MnSO ₄	0,1		

II. Среда Маттисон, Фалиной, Пасскель [282] (г):

картофельная			
мезга 1—4% (по сухой массе)			
NH ₄ H ₂ PO ₄	10,7	CuSO ₄	0,003
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,003
FeSO ₄	0,005	CoCl ₂	0,0005
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,005	экстракт солодовых ростков	5—20
		вода водопроводная	до 1 л

Среда Маттисон, Низковской, Сивочуб [281] (г):

глюкоза	20	MgSO ₄	0,5
NH ₄ NO ₃	3,5	экстракт солодовых ростков	5—20
KH ₂ PO ₄	1	вода водопроводная	до 1 л

Среда для глубинного выращивания вешенки обыкновенной [83] (г):

сахароза	30	отвар клевера	10% (по объему)
пептон	3	агар	0,01%

NaHPO_4	2	вода водопроводная	1 л
KCl	1,2	pH 6,0	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25		

Среда для глубинного выращивания сморчков [766] (г):

свекольная меласса	120	MgSO_4	0,7
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6	вода водопроводная	до 2 л
CaCO_3	4,8	pH 6,5	
K_2SO_4	1,7		

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзенберг В. Л., Билай В. Й. О методах первичного отбора пектолитически-активных культур микроскопических грибов.— Биологически активные вещества микроорганизмов. Кишинев, 1970, вып. 1, с. 65—74.
2. Алексеева В. М. Люминесцентномикроскопические исследования жировых и липоидных веществ.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1967, № 4/5, с. 575—583.
3. Алиханян С. И. Селекция промышленных микроорганизмов.— М. : Наука, 1968.— 392 с.
4. Альбертсон П. О. Разделение клеточных частиц и макромолекул.— М. : Мир, 1974.— 380 с.
5. Андреев Д. Н., Серебрякова В. Н. Электрофоретическое изучение мицелиальных белков некоторых представителей рода *Verticillium*.— В кн.: Тр. V Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969, вып. 1, с. 80—81.
6. Андреева Т. Ф., Осипова О. П. Количественное определение свободных и связанных аминокислот листьев при помощи хроматографии на бумаге.— В кн.: Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1962, с. 59—65.
7. Аравийский Р. А. Морфологическое и цитохимическое изучение защитных реакций фагоцитов при экспериментальном кандидозе : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Л., 1978.— 38 с.
8. Артемчук Н. Я. Методы обнаружения микромицетов в морских областях обитания.— В кн.: Материалы 3-й Закавказ. конф. : (Тбилиси, окт. 1968 г.). Тбилиси, 1968, с. 92—96.
9. Арутюнов В. Д. Приготовление постоянных препаратов для люминесцентной микроскопии.— Журн. общ. биологии, 1956, 17, № 1, с. 79—83.
10. А. с. 464615 (СССР). Жидкая питательная среда для культивирования продуцента каталазы / Р. Я. Карклинь, А. К. Пробокс, Г. А. Витола и др.— Оpubл. в Б. И., 1975, № 11.
11. А. с. 220917 (СССР). Способ культивирования муковых и гифальных грибов / Н. М. Пидопличко, В. И. Билай, Э. З. Коваль.— Оpubл. в Б. И., 1968, № 21.
12. Асатиани В. С. Методы биохимических исследований (руководство для врачей-лаборантов и биохимиков).— М. : Медгиз, 1956.— 472 с.
13. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа.— М. : Наука, 1969.— 740 с.

14. *Афанасенко О. С., Левитин М. М., Михайлова Л. А.* Методы изучения вирулентности и агрессивности возбудителя сетчатого гельминтоспориоза ячменя.— Микология и фитопатология, 1976, 10, вып. 5, с. 433—436.
15. *Ахрем А. А., Кузнецова А. И.* Тонкослойная хроматография.— М.: Наука, 1964.— 175 с.
16. *Барина С. А.* О цикле трикарбоновых кислот у плесневых грибов.— Микробиология, 1960, 29, вып. 1, с. 21—27.
17. *Басканьян И. А., Бирюков В. В., Крылов Ю. М.* Математическое описание основных кинетических закономерностей процесса культивирования микроорганизмов.— Микробиология, 1976, 5, вып. 1, с. 5—75.
18. *Безбородов А. М.* Изучение свободных аминокислот *Actinomyces phaeochromogenes*.— Микробиология, 1959, 28, вып. 5, с. 690—696.
19. *Безбородов А. М.* Метаболиты внутриклеточного фонда микроорганизмов.— М.: Наука, 1974.— 75 с.
20. *Безбородов А. М., Андреев Л. В., Черменский Д. Н., Попова Т. А.* Идентификация микроколичеств нуклеиновых оснований и нуклеозидов в мицелии гриба *Penicillium cyclopium*.— Прикл. биохимия и микробиология, 1971, 7, вып. 5, с. 537—543.
21. *Безбородов А. М., Безбородова С. И.* Внеклеточные рибонуклеазы в сравнительном аспекте.— В кн.: Биосинтез нуклеаз и протеаз микроорганизмами. М.: Наука, 1974, с. 117—120.
22. *Безбородов А. М., Гусева И. И., Круглая О. В., Суровцева В. М.* Первичная оценка микроскопических грибов как продуцентов алкалоидов.— Прикл. биохимия и микробиология, 1972, 8, вып. 6, с. 918—921.
23. *Безбородова С. И.* Нуклеазы микроскопических грибов.— В кн.: Нуклеазы микроорганизмов / Под ред. А. М. Безбородова.— М.: Наука, 1974а, с. 260—281.
24. *Безбородова С. И.* Рибонуклеазы микроскопических грибов и дрожжей.— В кн.: Нуклеазы микроорганизмов / Под ред. А. М. Безбородова.— М.: Наука, 1974б, с. 188—295.
25. *Безбородова С. И.* Сравнительное изучение внеклеточных рибонуклеаз грибов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Пушкино-на-Оке, 1977.— 48 с.
26. *Беккер З. Э.* Микрошкала для определения рН под микроскопом.— Ботан журн., 1935, 20, № 4, с. 348—351.
27. *Беккер З. Э.* Физиология грибов и их практическое использование.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1963.— 267 с.
28. *Беккер З. Э., Полетаева В. Ф.* Роль цинка в патогенезе фузариозного вилта и биосинтетической активности штаммов его возбудителя.— Изв. АН ТаджССР. Сер. биол. наук, 1977, № 2, с. 3—9.
29. *Беккер М. Э., Межиня Г. Д.* Теория и практика получения вторичных продуктов при непрерывном культивировании.— В кн.: Микробиология. Т. 4. Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1975, с. 52—75. (Итоги науки и техники / ВИНТИ).
30. *Бекмаханова Н. Е., Козловский А. Г., Безбородов А. М.* Отбор грибов — продуцентов алкалоидов методом тонкослойной хроматографии.— Прикл. биохимия и микробиология, 1975, 11, вып. 1, с. 131—135.
31. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры сложных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1963.— 590 с.

32. *Белозерский А. Н., Проскуряков Н. М.* Белки, продукты их распада и превращений.— В кн.: Практическое руководство по биохимии растений. М. : Сов. наука, 1951, с. 106—208.
33. *Беляева И. Д.* Метод радиографии.— Современ. методы в биохимии, 1977, вып. 3, с. 343—348.
34. *Белякова Л. А.* Гамма-излучение как средство дезинфекции книг от плесневых грибов.— Микробиология, 1960, 29, вып. 5, с. 762—765.
35. *Белякова Л. А., Лебедева М. К., Налепина Л. Н.* О поддержании культур грибов в отделе типовых культур Института микробиологии СССР.— Микология и фитопатология, 1975, 9, № 2, с. 153—156.
36. *Бенкен А. А., Гайке М. В., Хацкевич Л. К.* Сетчатый гельминтоспориоз ячменя.— В кн.: Тр. V Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969, вып. 5/2, с. 38—42.
37. *Бергер Э. Г., Вассер С. П.* К анализу базидии высших Basidiomycetes на основе геометрических зависимостей.— В кн.: Актуальные вопросы современной ботаники. Киев : Наук. думка, 1976, с. 16—30.
38. *Берестецкий О. А.* Об изменении почвенной микрофлоры плодовыми растениями в связи с токсичностью садовых почв.— В кн.: Материалы первого межвуз. совещ. по агрофитоценологии (Казань, 1969). Казань : Изд-во Казан. ун-та, 1969, с. 161—167.
39. *Берестецкий О. А.* Токсикоз почв под многолетними плодовыми насаждениями.— Почвоведение, 1971, № 7, с. 56—63.
40. *Берестецкий О. О.* Вивчення фітотоксинів *Penicillium claviforme* Bainier і *Penicillium breviscompactum* Dierckx.— Мікробіол. журн., 1972а, 34, № 3, с. 377—381.
41. *Берестецкий О. О.* Простий метод виявлення фітотоксичних речовин, утворюваних мікроорганізмами.— Мікробіол. журн., 1972б, 34, № 6, с. 798—799.
42. *Берестецкий О. О., Патица В. П., Калмикова Н. А.* Виділення та ідентифікація фітотоксичних речовин *Penicillium rivolii* Zaleski шт. 1066.— Мікробіол. журн., 1975, 37, № 1, с. 11—14.
43. *Берестецкий О. О., Патица В. Ф., Надкерничний С. П.* Фітотоксичні властивості *Aspergillus fumigatus* Fresenius.— Мікробіол. журн., 1974, 36, № 5, с. 581—586.
44. *Бернхард С.* Структура и функции ферментов.— М. : Мир, 1971.— 334 с.
45. *Берчфилд Г., Сторрс Э.* Газовая хроматография в биохимии.— М. : Мир, 1964.— 619 с.
46. *Билай В. И.* Действие экстрактов токсических грибов на животные и растительные ткани.— Микробиология, 1948, 17, вып. 2, с. 142—147.
47. *Билай В. И.* Микроскопические грибы — продуценты антибиотиков.— Киев : Изд-во АН УССР, 1961.— 187 с.
48. *Билай В. И.* Биологически активные вещества микроскопических грибов и их применение.— Киев : Наук. думка, 1965.— 267 с.
49. *Билай В. И.* Ферментативный гидролиз природных растительных полимеров.— В кн.: Ферменты в медицине; пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Киев : Наук. думка, 1968, с. 18—25.
50. *Билай В. И.* Определение роста и биосинтетической активности грибов.— В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев : Наук. думка, 1973, с. 5—16.
51. *Билай В. И.* Основы общей микологии.— Киев : Вища школа, 1980.— 360 с.

52. *Билай В. И.* Физиологические основы жизнедеятельности грибов в почве.— В кн.: Систематика, экология и физиология почвенных грибов : Тез. докл. I Респ. конф. (Киев, окт. 1975 г.). Киев : Наук. думка, 1975, с. 4—6.
53. *Билай В. И.* Фузариин.— Киев : Наук. думка, 1977.— 440 с.
54. *Билай В. И., Горбик Л. Т.* О люминесценции перегородок у видов *Fusarium*.— Микробиология, 1974, 43, вып. 3, с. 548—550.
55. *Билай В. И., Пидопличко Н. М.* Токсинообразующие микроскопические грибы и вызываемые ими заболевания человека и животных.— Киев : Наук. думка, 1970.— 290 с.
56. *Билай В. И., Пидопличко Н. М., Стрижевская А. Я., Вьюн А. А.* К характеристике ксиланазной активности некоторых почвенных гифальных грибов.— В кн.: Экспериментальная микология. Киев : Наук. думка, 1968, с. 8—14.
57. *Билай В. И., Пидопличко Н. М., Тарадий Г. В. и др.* Целлюлозолитические свойства плесневых грибов и принципы отбора активных продуцентов целлюлаз.— В кн.: Ферментативное расщепление целлюлозы. М. : Наука, 1967, с. 35—45.
58. *Билай В. И., Стрижевская А. Я., Лизак Ю. В., Тарадий Г. В.* Сравнительная целлюлазная и гемицеллюлазная активность почвенных микромицетов.— В кн.: Экспериментальная микология. Киев : Наук. думка, 1968, с. 3—7.
59. *Билай В. И., Элланская И. А.* Метод микрокультуры для получения типичного конидиеобразования у фузариев.— Микология и фитопатология, 1975, 9, вып. 1, с. 74—76.
60. *Білай В. Й.* Вплив фузаріозного зараження хлібних злаків на схожість та ріст ростків.— Мікробіол. журн., 1951, 13, № 4, с. 3—14.
61. *Білай В. Й., Черкес О. Й., Богомолова Л. О., Французова С. Б.* Токсикобіологічні властивості фузарієвої кислоти.— Мікробіол. журн., 1975, 37, № 3, с. 325—328.
62. *Биохимические методы в физиологии растений* / Под ред. О. А. Павлинова.— М. : Наука, 1971.— 227 с.
63. *Бирбин С. С.* К вопросу о фузариотоксикозе кур и уток : Автореф. дис. ... канд. вет. наук.— Саратов, 1967.— 24 с.
64. *Бирюзова В. И., Боровягин В. М., Гилев В. П. и др.* Электронно-микроскопические методы исследования биологических объектов.— М. : Изд-во АН СССР, 1963.— 204 с.
65. *Бланков Б. И., Клебанов Д. Л.* Применение лиофилизации в микробиологии.— М. : Медгиз, 1961.— 263 с.
66. *Блинов Н. О., Хохлов А. С.* Бумажная хроматография антибиотиков.— М. : Наука, 1970.— 186 с.
67. *Бобкова И. С., Афанасьева О. В., Киянская Л. Д.*— Флуорометрический метод определения количества мертвых клеток в прессованных дрожжах.— Прикл. биохимия и микробиология, 1971, 7, вып. 5, с. 487—489.
68. *Богомолова Л. О.* Утворення фузарієвої кислоти *Fusarium moniliforme* і *F. oxysporum*.— Мікробіол. журн., 1969, 31, № 4, с. 314—318.
69. *Богомолова Л. А., Лемещенко Г. П.* Изучение биологического действия фузариевой кислоты на белых мышей.— В кн.: Систематика, экология и физиология почвенных грибов : Тез. докл. I Респ. конф. (Киев, окт. 1975). Киев : Наук. думка, 1975, с. 122—124.
70. *Богомолова Л. А., Лизак Ю. В.* Образование целлюлазы и фузариевой кислоты некоторыми видами *Fusarium oxysporum* Schlecht emend. Snyd, et Hans.— В кн.: Систематика, экология и физиоло-

- гия почвенных грибов : Тез. докл. I Респ. конф. (Киев, окт. 1975) Киев : Наук. думка, 1975, с. 103.
71. *Большой практикум по микробиологии* / Под ред. Г. Л. Селибера. — М. : Высш. школа, 1962. — 492 с.
 72. *Бондарцев А. С.* Трутовые грибы европейской части СССР и Кавказа. — Л. : Изд-во АН СССР, 1953. — 1106 с.
 73. *Бондарцев А. С., Зингер Р. А.* Руководство по сбору высших базидиальных грибов для научного их изучения. — Тр. Ботан. ин-та им. В. Л. Комарова АН СССР. Сер. 2, 1950, вып. 6, с. 499—543.
 74. *Борозенец А. С.* Химический метод определения грибка *Fusarium* в зерне. — Тр. Дальневосточ. мед. ин-та, 1935, т. 2, с. 1.
 75. *Бояркин А. Н.* Простой хроматографический и капельный метод определения сахаров на фильтровальной бумаге. — Физиология растений, 1955, 2, вып. 3, с. 298—302.
 76. *Бояркин А. Н.* Разноцветное проявление аминокислот на бумажных хроматограммах. — Физиология растений, 1956, 3, вып. 4, с. 381—386.
 77. *Бранд Дж., Эглинтон Г.* Применение спектроскопии в органической химии. — М. : Мир, 1967. — 279 с.
 78. *Браун В.* Генетика бактерий / Под ред. С. И. Алиханяна. — М. : Наука, 1968. — 446 с.
 79. *Бриан Л., Кайз В.* Методы практической биохимии / Под ред. С. Е. Северина и А. Д. Виноградова. — М. : Мир, 1978. — 267 с.
 80. *Бурачевский И. И.* Непрерывное культивирование плесневых грибов. — В кн.: Инженерные проблемы микробиологического синтеза : Материалы Всесоюз. конф. по пробл. биоинженерии. М., 1969, с. 214—215.
 81. *Бутенко Р. Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М. : Наука, 1964. — 272 с.
 82. *Бухало А. С.* Рост съедобных базидиомицетов в глубинной культуре. — Микология и фитопатология, 1973, 7, вып. 4, с. 348—353.
 83. *Бухало А. С., Пархоменко Л. П., Мартыненко М. М.* Вирощування міцелію плеврота черепичастого (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kümme) у чистій культурі. — Мікробіол. журн., 1975, 37, № 3, с. 181—184.
 84. *Былинкина Е. С., Штоффер Л. Д.* Непрерывная ферментация антибиотиков. — В кн.: Микробиология. Т. 4. Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1975, с. 107—123. (Итоги науки и техники / ВИНТИ).
 85. *Бырдоров С. В.* Экспериментальная микробиология. — София : Медицина и физкультура, 1965. — 396 с.
 86. *Вакуленко В. А., Витковская В. А., Журавель С. А. и др.* Подбор среды для выращивания *Penicillium vitale* в оптимальных условиях глубинного биосинтеза глюкозооксидазы этим грибом. — В кн.: Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Киев : Наук. думка, 1968, с. 150—152.
 87. *Вальдштейн Э. А., Жестяников В. Д., Парибок В. П.* Восстановление *E. coli* B, облученных альфа-частицами в воздухе и в азоте. — В кн.: Защита и восстановление при лучевых повреждениях. М. : Наука, 1966, с. 25—31.
 88. *Василевская А. И.* Изучение роли меланинового пигмента в устойчивости почвенных темноцветных гифомицетов к γ -облучению : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1976. — 21 с.
 89. *Васильева Л. Н.* Агариковые шляпочные грибы Приморского края. — Л. : Наука, 1973. — 331 с.

90. Величко Б. А., Чернова Г. А., Калунянц К. А. и др. Способы приготовления посевного материала при глубинном культивировании микроорганизмов.— Тр. ВНИИ биосинтеза белковых веществ, 1974, вып. 2, с. 39—44.
91. Венкстерн Т. В., Баев А. А. Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот.— М.: Наука, 1967.— 79 с.
92. Виестур У. Э., Кристансонс М. Ж., Долгицер Н. С. Способы и устройства для пеногашения в микробиологических процессах.— М., 1973.—126 с.— (ОНТИТЭИ Главмикробиопром. Сер. 6).
93. Виноградский С. Н. Микробиология.— М.: Изд-во АН СССР, 1952а.— 387 с.
94. Виноградский С. Н. Микробиология почвы: Пробл. и методы. 50 лет исследований.— М.: Изд-во АН СССР, 1952б.— 792 с.
95. Волков Г. Д., Липин В. А., Черкасов Д. П. Радиобиология.— М.: Колос, 1964.— 232 с.
96. Воробьева Л. В., Гвоздев Р. И. Ультрафильтрация биополимеров через ацетилцеллюлозные мембраны.— В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977, с. 231—236.
97. Воронкевич И. В., Овчинникова Л. Н. Сравнительная устойчивость фитопатогенных бактерий к УФ-лучам.— Журн. общ. биологии, 1962, 23, № 6, с. 471—474.
98. Воскресенский П. И. Техника лабораторных работ.— М.: Химия, 1978.— 718 с.
99. Вотрин И. И., Дебов С. Е., Мардашев С. Ф. и др. Белки рибосомальные, электрофоретическое разделение на колонке в условиях линейного градиента рН.— Биохимия, 1970, 35, вып. 4, с. 687—692.
100. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина А. М. Большой практикум по физиологии растений.— М.: Высш. школа, 1975.— 392 с.
101. Гайле В. К., Румба А. А., Карклин Р. Я. Разложение посевного материала и сохранение активности культур плесневых грибов рода *Aspergillus*.— В кн.: Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1973, с. 113—118.
102. Гарибова Л. В., Горбунова Н. П., Сидорова И. И., Сизова Т. П. Низшие растения.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1975.— 152 с.
103. Гарибова Л. В., Сафран А. И., Шалашова Н. Б. Условия плодоношения некоторых видов рода *Agaricus* Fr. emend Karst.— Микология и фитопатология, 1974, 8, вып. 3, с. 259—264.
104. Гейл Э., Кандлифф Э., Рейнолдс П. и др. Молекулярные основы действия антибиотиков.— М.: Мир, 1975.— 478 с.
105. Гиноман Л. М. Хроматография белков на ионообменниках и сефадексах.— В кн.: Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1971, с. 37—73.
106. Гиноман Л. М. Очистка протеиназ.— В кн.: Химия протеолитических ферментов: Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеиназ (Вильнюс, май 1973). Вильнюс, 1973, с. 15—21.
107. Гительзон И. И., Фиш А. М., Чумакова Р. И., Кузнецов А. М. Максимальная скорость размножения бактерий и возможности ее определения.— Докл. АН СССР. Сер. биол., 1973, 211, № 6, с. 1453—1455.
108. Гойман Э. Инфекционные болезни растений.— М.: Изд-во иностр. лит., 1954.— 608 с.
109. Головинский Е. В. Манометрический метод Варбурга в исследова-

- ниях клеточного обмена.— В кн.: Экспериментальная микробиология. София : Медицина и физкультура, 1965, с. 145—153.
110. Горбик Л. Т. Метод визначення інтенсивності конідієутворення у грибів роду *Fusarium* Lk. ex Fr.— Мікробіол. журн., 1976, 38, № 2, с. 239—240.
 111. Гордон А., Форд Р. Спутник химика.— М. : Мир, 1976.— 541 с.
 112. Горленко М. В. Сельскохозяйственная фитопатология.— М. : Высш. школа, 1968.— 434 с.
 113. Городецкий А. А., Киричинский Б. Р., Липкан Н. Ф. Очерки по радиобиологии.— Киев : Изд-во АН УССР, 1961.— 222 с.
 114. Готтлиб Д., Шау П. Механизм действия антибиотиков / Под ред. Г. Ф. Гаузе.— М. : Мир, 1969.— 718 с.
 115. Гофман Ю. А., Саянов В. В. Об осаждении белков семян трихлоруксусной кислотой.— Биохимия, 1965, 30, вып. 2, с. 12—19.
 116. Грегори Ф. Микробиология атмосферы.— М. : Мир, 1964.— 371 с.
 117. Грейг-Смит П. Количественная экология растений.— М. : Мир, 1967.— 358 с.
 118. Григорьева Т. Ю., Проскурякова Н. С. Количественный метод определения дендродохинов.— В кн.: Тез. докл. симпоз. по микотоксинам (Киев, 3—6 окт. 1972 г.). Киев : Наук. думка, 1972, с. 55.
 119. Гров Д. С., Рендал В. А. Руководство по лабораторным методам исследования антибиотиков / Под ред. Г. Велч, Ф. Марти-Ибаньес.— М. : Медгиз, 1958.— 295 с.
 120. Гродзенский Д. Э. Радиобиология.— М. : Атомиздат, 1966.— 231 с.
 121. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений.— Киев : Наук. думка, 1973.— 592 с.
 122. Громова Б. Б. Электрофоретические свойства водорастворимых белков *Phytophthora infestans* (Mont) D.— Микология и фитопатология, 1970, 4, вып. 4, с. 358—359.
 123. Губанов Г. Я. Вилт хлопчатника.— М. : Колос, 1972.— 455 с.
 124. Губен-Вейль. Методы органической химии.— М. : Госхимиздат, 1963.— Т. 2. 1032 с.
 125. Гудкова Л. В., Дегтярь Р. Г. Метод определения активности пероксидазы.— В кн.: Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Киев : Наук. думка, 1968, с. 172—173.
 126. Гуськова Л. И., Демушкин В. П. Современные методы хроматографического анализа нуклеиновых кислот и их компонентов.— Успехи химии, 1974, 43, вып. 7, с. 1241—1281.
 127. Дахновский В. И. *Saccharomyces fragilis* D-25 — новый высокочувствительный к фузарину штамм дрожжей.— В кн.: Тез. докл. симпоз. по микотоксинам (Киев, 3—6 окт. 1972 г.). Киев : Наук. думка, 1972, с. 21.
 128. Девяткин Б. А. Методы химического анализа в производстве витаминов.— М. : Медицина, 1964.— 360 с.
 129. Дегтева Г. К. Опыт разделения белков электрофорезом в полиакриламидном геле.— Учен. зап. Горьк. ун-та. Сер. биол., 1970, вып. 110, с. 115—117.
 130. Дегтярь Р. Г. Методы определения активности глюкозооксидазы.— В кн.: Белки в медицине и народном хозяйстве. Киев : Наук. думка, 1965, с. 171—172.
 131. Дементьева М. И. Фитопатология.— М. : Колос, 1977.— 367 с.
 132. Диксон Д., Уэбб Э. Ферменты.— М. : Изд-во иностр. лит., 1968.— 731 с.

133. *Добромыслов В. В., Дроздов А. И., Конев Ю. Е.* Об экспериментальной модели висцерального микоза на мышах и крысах.— В кн.: Экспериментальные и клинические исследования по антибиотикам. Л. : Медицина, 1958, с. 192—197. (Сб. тр. Ленингр. ин-та антибиотиков; Т. 1).
134. *Добромыслов В. В., Конев Ю. Е., Дроздов А. И.* К вопросу о получении модели экспериментальных онихомикозов у животных.— В кн.: Экспериментальные и клинические исследования по антибиотикам.— Л. : Медицина, 1968, с. 197—203 (Сб. тр. Ленингр. ин-та антибиотиков; Т. 1).
135. *Добрынина В. И.* Биологическая химия.— М. : Медицина, 1976.— 504 с.
136. *Доскочилова Д., Вондрачек М.* Микрометоды идентификации и изучения антибиотиков из микромицетов.— Антибиотики, 1961, 6, № 7, с. 64—69.
137. *Дубинин Н. П.* Проблемы радиационной генетики.— М. : Госатомиздат, 1961.— 468 с.
138. *Дудка И. А.* Классификационные схемы несовершенных грибов порядка Moniliales и положение в них водных гифомицетов.— В кн.: Новости систематики высших и низших растений. Киев : Наук. думка, 1977, с. 134—203.
139. *Дудка І. О.* Нові системи порядку Hyphomycetales (Moniliales).— Укр. ботан. журн., 1968, 25, вип. 2, с. 3—16.
140. *Дудкин М. С.* Ксилан.— Успехи химии, 1962, 31, вып. 10, с. 10—20.
141. *Дьяков Ю. Т., Семенова И. Т., Успенская Г. Д.* Общая фитопатология с основами иммунитета.— М. : Колос, 1976.— 256 с.
142. *Дэвениш Т., Гергей Я.* Аминокислоты, пептиды и белки.— М. : Мир, 1976.— 364 с.
143. *Дэвидсон Дж.* Биохимия нуклеиновых кислот / Под ред. А. Н. Белозерского.— М. : Мир, 1968.— 333 с.
144. *Дэгли С., Никольсон Д.* Метаболические пути.— М. : Мир, 1973.— 310 с.
145. *Евлахова А. А.* Энтомопатогенные грибы.— Л. : Наука, 1974.— 259 с.
146. *Егоров Н. С.* Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности.— М. : Высш. школа, 1965.— 202 с.
147. *Егоров Н. С.* Основы учения об антибиотиках.— 2 изд., испр. и доп.— М. : Высш. школа, 1969.— 470 с.
148. *Ежов В. А., Санцевич Н. И., Безбородова С. И.* Влияние ортофосфата на биосинтез внеклеточных фосфогидролаз *Pen. breviscomptum*.— Микробиология, 1976, 45, вып. 2, с. 253—258.
149. *Елинов Н. П.* Патогенные дрожжеподобные грибы.— Л. : Медицина, 1964.— 382 с.
150. *Епифанова О. И., Терских В. В.* Метод радиографии в изучении клеточных циклов.— М. : Наука, 1969.— 119 с.
151. *Ермаков В. В., Костюнина Н. А., Курманов И. А.* Способ получения эпокситрихотецена Т-2.— В кн.: Микотоксины : Тез. докл. симпоз. по микотоксинам (Оренбург, 28—30 сент. 1977 г.). Оренбург : Юж. Урал, 1977, с. 42—43.
152. *Жданова Н. М.* Про стійкість деяких темнозабарвлених гифомицетів до дії УФ променів.— Мікробіол. журн., 1964, 26, № 12, с. 75—82.
153. *Жданова Н. М., Василевська А. І., Гаврюшина А. І.* Відновлення

- від уражень після УФ- і γ -опромінення *Cladosporium transchelii* та його мутантів.— Мікробіол. журн., 1977, 39, № 2, с. 164—169.
154. Жданова Н. Н., Василевская А. И., Гаврюшина А. И. Радиочувствительность видов темноцветных гифомицетов (Dematiaceae).— Микология и фитопатология, 1974, 8, вып. 1, с. 8—12.
 155. Жданова Н. Н., Люличев А. Н., Василевская А. И. и др. Выживаемость некоторых видов темноокрашенных грибов под влиянием искусственного солнечного излучения.— В кн.: Космические исследования на Украине. Киев : Наук. думка, 1978, с. 20—24.
 156. Жданова Н. Н., Мележик А. В., Василевская А. И. и др. Процессы образования и гибели фотоиндуцированных парамагнитных центров в меланинсодержащих грибах.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1978, № 4, с. 576—581.
 157. Жданова Н. Н., Походенко В. Д. Спектры ЭПР и радиоустойчивость некоторых видов семейства Dematiaceae.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1970, № 1, с. 83—86.
 158. Жданова Н. Н., Пьянков Г. Н. Влияние мощности дозы γ -излучения Co^{60} на выживаемость некоторых видов Dematiaceae.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1967, № 3, с. 438—442.
 159. Жданова Н. Н., Пьянков Г. Н., Бондарь А. И. О прямом действии γ -излучения Co^{60} на конидии Dematiaceae.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1968, № 4, с. 584—590.
 160. Жданова Н. Н., Свищук А. А., Шмыгун М. П. и др. О защитном действии пигмента, выделенного из гриба *Cladosporium* sp.— Микробиология, 1970, 39, вып. 4, с. 603—607.
 161. Жестяников В. Д. Восстановление и радиорезистентность клетки.— Л. : Наука, 1968.— 351 с.
 162. Жизнь растений. Т. 2. Грибы.— М. : Просвещение, 1975.— 479 с.
 163. Заварзин Г. А. Фенотипическая систематика бактерий : Пространство логических возможностей.— М. : Наука, 1974.— 141 с.
 164. Зайцева Г. Н., Белозерский А. Н. Химия азотобактера. Аминокислотный состав *Azotobacter agile* в зависимости от возраста культуры.— Микробиология, 1957, 26, вып. 5, с. 533—540.
 165. Зайцева Г. Н., Тюленева Н. Н. Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования производных с нингидрином.— Лаб. дело, 1958, № 3, с. 24—28.
 166. Закордонец Л. А. Сравнительное изучение состава свободных аминокислот микромицетов : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1967.— 16 с.
 167. Закордонец Л. А., Закордонец О. А., Коваль Э. З., Швед А. Д. Електронно-мікроскопічне дослідження міцелію *Fusarium moniliforme* Sheld.— Мікробіол. журн., 1975, 37, № 4, 443—447.
 168. Закордонец Л. А., Метейко Т. Я. Определение аминокислот и белка у грибов.— В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев : Наук. думка, 1973, с. 111—125.
 169. Захаров И. А. Анализ скрещиваний у микроорганизмов при половом и бесполом размножении.— В кн.: Генетика и селекция микроорганизмов / Под ред. С. И. Алиханяна.— М. : Наука, 1964, с. 61—81.
 170. Захаров И. А. Гибридологический анализ у грибов.— В кн.: Генетические основы устойчивости растений к болезням / Под ред. М. М. Левитина.— Л. : Колос, 1977, с. 5—16.
 171. Захаров И. А., Квитко К. В. Генетика микроорганизмов.— Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1967.— 224 с.

172. *Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В.* Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов.— Л. : Наука, 1976.— 112 с.
173. *Захаров И. А., Кривиский А. С.* Радиационная генетика микроорганизмов.— М. : Атомиздат, 1972.— 295 с.
174. *Зеленин А. В.* Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот.— М. : Наука, 1967.— 136 с.
175. *Зенкевич Л. А.* О положении ботаники и зоологии в системе биологических наук.— Бюл. Моск. о-ва испытателей природы, 1966, 7, № 3, с. 3—15.
176. *Зеров Д. К.* Очерк филогении бессосудистых растений.— Киев : Наук. думка, 1972.— 315 с.
177. *Иванов И. Д., Рахлеева Е. Е.* Полярография, структура и функция биополимеров.— М. : Наука, 1968.— 344 с.
178. *Иерусалимский Н. Д.* Метод проточного культивирования микроорганизмов и возможности его применения.— В кн.: Непрерывное брожение и выращивание микроорганизмов. М. : Пищепромиздат, 1960, с. 9—20.
179. *Иерусалимский Н. Д.* Основы физиологии микробов.— М. : Изд-во АН СССР, 1963.— 244 с.
180. *Иерусалимский Н. Д., Конова И. В., Неронова Н. М., Анчунова А. Н.* Определение витамина B₁₂ биоавтографическим способом.— Витамин. ресурсы и их использ., 1961, вып. 5, с. 119—127.
181. *Иерусалимский Н. Д., Неронова Н. М.* Количественная зависимость между концентрацией продуктов обмена и скоростью роста микроорганизмов.— Докл. АН СССР. Сер. биол., 1965, 161, № 6, с. 1437—1440.
182. *Илков А. Т.* Изотопные методы в микробиологии.— В кн.: Экспериментальная микробиология / Под ред. С. В. Бырдарова. София : Медицина и физкультура, 1965, с. 166—195.
183. *Имшенецкий А. А.* Вступительное слово.— В кн.: Непрерывное брожение и выращивание микроорганизмов. М. : Пищепромиздат, 1960, с. 7—8.
184. *Инге-Вечтомов С. Г.* Генетика пола у грибов.— В кн.: Генетические основы устойчивости растений к болезням / Под ред. М. М. Левитина.— Л. : Колос, 1977, с. 31—44.
185. *Кабаков Е. Н., Корогодин В. И.* О природе плато фотореактивации дрожжевых клеток.— В кн.: Защита и восстановление при лучевых повреждениях. М. : Наука, 1966, с. 109—117.
186. *Каверзнева Е. Д.* Методы определения активности протеиназ.— В кн.: Химия протеолитических ферментов : Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеаз. Вильнюс, 1973, с. 3—7.
187. *Калверт Дж., Питтс Дж.* Фотохимия.— М. : Мир, 1968.— 671 с.
188. *Каменева С. В.* Использование парасексуального процесса в селекции грибов-продуцентов антибиотиков, органических кислот и ферментов.— В кн.: Генетические основы селекции микроорганизмов / Под ред. С. И. Алиханяна.— М. : Наука, 1969, с. 88—108.
189. *Каменева С. В.* Молекулярные механизмы генетического контроля темпов спонтанного мутирования.— Успехи соврем. генетики, 1976, 6, с. 86—101.
190. *Каменева С. В.* Гетерокариозис и парасексуальный процесс у мицелиальных грибов.— В кн.: Генетические основы устойчивости растений к болезням / Под ред. М. М. Левитина.— Л. : Колос, 1977, с. 16—31.

191. Карасева Е. В., Минаева Л. А., Филиппов А. В. и др. Экспресс-метод определения жизнеспособности конидий *Phytophthora infestans* (Mont.) DB.— Микология и фитопатология, 1976, 10, вып. 4, с. 336—338.
192. Карасева Е. В., Мочалкин А. И., Алексеев С. И. О вторичной люминесценции уредоспор стеблей и бурой ржавчины пшеницы.— Биол. науки, 1970, 13, № 3, с. 128—131.
193. Карклин Р. Я. Антисептизация питательных сред в процессе лимоннокислого брожения.— В кн.: Микробный синтез биологически активных веществ. Рига : Зинатне, 1968, с. 63—77.
194. Карклин Р., Пробок А., Гайле В. и др. Регламент технологического процесса производства итаконовой кислоты.— Рига : Зинатне, 1965.— 72 с.
195. Карклин Р., Румба А., Озола Р. и др. Технологическая инструкция производства сухих спор штамма ЭУ-119 *Aspergillus niger* (продуцента лимонной кислоты).— Рига : Зинатне, 1967.— 11 с.
196. Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки.— М. : Наука, 1978.— 209 с.
197. Карпов В. Л. Применение отечественных ионообменных смол и бумажной хроматографии для анализа свободных аминокислот, меченных углеродом.— В кн.: Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1962, с. 71—79.
198. Катарьян Б. Т. Фитотоксические свойства сапрофитных грибов виноградной лозы.— С.-х. биология, 1967, 2, № 2, с. 282—289.
199. Кашкин П. Н. Кандидозы.— Л. : Медгиз, 1958.— 237 с.
200. Кашкин П. Н. Медицинская микология.— Л. : Медгиз, 1962.— 360 с.
201. Кашкин П. Н. Дерматомикозы.— Л. : Медицина, 1967.— 382 с.
202. Кашкин П. Н., Елинов Н. П., Дроздов А. И. Антигены для серологических реакций и аллергических проб при грибковых заболеваниях.— Л. : Ленингр. ин-т усовершенствования врачей, 1959.— 20 с.
203. Кашкин П. Н., Елинов Н. П. Кокцидиоз и гистоплазмоз.— Л. : Медицина, 1969.— 98 с.
204. Кашкин П. Н., Лещенко В. М., Кашкин А. П. Методическое письмо по лабораторной диагностике глубоких микозов.— М. : М-во здравоохранения СССР, 1972.— 30 с.
205. Кашкина Г. Б., Абатуров Ю. Д. Выживание почвенных микроорганизмов при облучении почвы γ -лучами.— Радиобиология, 1967, № 2, с. 263—267.
206. Каюкова В. А., Розов Н. Ф., Шатилов И. С. Спектрофотометрическое определение витаминов В₁, В₆ и С в растениях с их одновременным обнаружением на хроматограмме в тонком слое силикагеля.— Докл. ВАСХНИЛ, 1973, № 1, с. 10—12.
207. Кибардин С. А., Лазуркин В. Б. Тонкослойная хроматография белков на пластинках с гидроксилпатитом.— Биохимия, 1965, 30, вып. 3, с. 559—563.
208. Кильчевская М. А. Метаболический атлас.— Минск : Вышэйш. школа, 1976.— 199 с.
209. Киприллова Е. Н. Использование некоторых ферментов для освобождения пантотеновой кислоты и ее связанных форм.— Вопр. питания, 1965, вып. 2, с. 15—17.
210. Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф., Вереш Й. Поддержание грибных культур.— В кн.: Методы фитопатологии. М. : Колос, 1974, с. 181—182.

211. *Кириленко Т. С.* Выделение грибов из почвы.— В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев : Наук. думка, 1973, с. 175—195.
212. *Кириленко Т. С.* Новий метод виділення спор грибів для одержання чистих культур.— Мікробіол. журн., 1977, 39, № 2, с. 233—235.
213. *Клюшник П. И.* О микоризе дуба.— Лесн. хоз-во, 1951, № 4, с. 31—35.
214. *Коваль Е. З., Сиверс В. С., Редчиц Т. I.* Новий спосіб підготовки конідій грибів, які не змочуються водою, для точного їх підрахунку.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 1, с. 126—128.
215. *Коваль Е. З., Швед А. Д.* Дослідження будови поверхні і складу оболонки деяких видів фузаріїв.— Мікробіол. журн., 1975, 37, № 4, с. 447—455.
216. *Коваль Э. З.* Определитель энтомофильных грибов СССР.— Киев : Наук. думка, 1974.— 257 с.
217. *Ковальская Л. Н., Силаева С. В.* Действие γ -радиации на физиологию роста и развитие плесневых грибов.— В кн.: Биофизика и радиобиология. Киев : Наук. думка, 1968, с. 126—130.
218. *Коган С. Б.* Быстрый метод отбора актиномицетов, продуцирующих витамины группы В.— В кн.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве : Тез. докл. II межвуз. науч. конф. (Москва, 1968). М. : Изд-во Моск. ун-та, 1968, с. 120—121.
219. *Козакова О. В.* Хроматография по сродству (биоспецифическая хроматография).— В кн.: Современные методы в биохимии. М. : Медицина, 1977, с. 215—223.
220. *Козлов Э. А.* Белковые структурные компоненты и исследования белка тел включения вируса ядерного полиедроза : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1967.— 24 с.
221. *Колеснева Г. В.* К характеристике целлюлозолитических свойств некоторых видов пенициллов.— В кн.: Экспериментальная микология. Киев : Наук. думка, 1968, с. 15—22.
222. *Колориметрический* метод определения содержания белка по методу Лоури.— В кн.: Современные методы биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М. : Медицина, 1964, с. 81—82.
223. *Колосков С. П.* Оборудование предприятий ферментной промышленности.— М. : Изд-во пищ. пром-сти, 1969.— 383 с.
224. *Кон В.* Разделение производных нуклеиновых кислот при помощи хроматографии на ионообменных колонках.— В кн.: Нуклеиновые кислоты / Под ред. Э. Чаргаффа и Дж. Дэвидсона.— М. : Изд-во иностр. лит., 1957, с. 464—487.
225. *Кондратенко Ю. К.* Лиофильный метод хранения производственных штаммов — продуцентов пенициллина и стрептомицина.— Антибиотики, 1958, 3, № 3, с. 103—108.
226. *Кондратьев К. Я.* Лучистая энергия солнца.— Л. : Гидрометеорол. изд-во, 1954.— 192 с.
227. *Конев Ю. Е., Камышко О. П.* О новом методе выделения почвенных микромицетов.— Микология и фитопатология, 1969, 3, № 4, с. 387—389.
228. *Константинов Г.* Ферменты углеводного обмена.— В кн.: Экспериментальная микробиология. София : Медицина и физкультура, 1965.— 485 с.
229. *Корогодина В. И.* Действие ионизирующих излучений на клетки.— М. : Наука, 1964, с. 82—130.
230. *Корогодина В. И.* Проблемы пострadiационного восстановления.— М. : Атомиздат, 1966.— 391 с.

231. *Коротченко Н. И.* Содержание и методы определения витаминов в кормовых дрожжах.— М. : Моск. правда, 1963.— 206 с.
232. *Костюнина Н. А., Ермаков В. В.* Выделение и идентификация зеараленона.— Ветеринария, 1976, № 11, с. 101.
233. *Кошевой Ю. В., Лежнев Э. И., Макарова О. П.* Прижизненная морфология клеток.— М. : Наука, 1977.— 128 с.
234. *Краевский А. А., Куханова М. К., Готтих Б. П.* Молекулярная биология.— М. : Наука, 1977.— 114 с.
235. *Красильников Н. А.* Микроорганизмы почвы и высшие растения.— М. : Изд-во АН СССР, 1958.— 463 с.
236. *Кретович В. Л.* Основы биохимии растений.— М. : Высш. школа, 1964.— 380 с.
237. *Кретович В. Л.* Введение в энзимологию.— М. : Наука, 1974.— 351 с.
238. *Кривченко В. И., Власова Э. А., Тимошенко З. В.* Методические указания по ускоренной оценке устойчивости овощных культур к болезням и расовой дифференциации их возбудителей.— Л. : Всесоюз. ин-т защиты растений, 1975.— 33 с.
239. *Кристипсон М. Ж., Стурман И. А., Виестур У. Э. и др.* Конструктивные варианты и технологические возможности лабораторного стенда для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов типа ФС.— В кн.: Культивирование микроорганизмов. Рига : Зинатне, 1969, с. 13—63.
240. *Кудрявцев В. И.* Коллекции типовых культур микроорганизмов.— Микробиология, 1963, 32, № 5, с. 902—910.
241. *Кузнецов В. Д., Лягина Н. М., Сорокина Е. И., Абызова Л. Ф.* Некоторые вопросы хранения культур актиномицетов и грибов в лабораторных условиях.— Микробиология, 1962, 31, № 4, с. 731—737.
242. *Кузнецов Л. В., Максимова Н. И., Скрипка О. В.* Биохимические мутанты возбудителя пузырчатой головни кукурузы и их исследование при изучении взаимоотношений паразита и растения-хозяина.— В кн.: Методы исследований патологических изменений растений. М. : Колос, 1976, с. 95—112.
243. *Курасова В. В., Костин В. В., Малиновская Л. С.* Методы исследования в ветеринарной микологии / Под ред. Н. А. Спесивцевой.— М. : Колос, 1971.— 312 с.
244. *Курманов И. А., Таланов Г. А.* К методике определения токсичности фуражного зерна.— Ветеринария, 1975, № 4, с. 94—95.
245. *Курсанов Л. И.* Микология.— М. ; Л. : Учпедгиз, 1940.— 480 с.
246. *Куцева Л. С.* Микробиологические методы определения витамина В₁₂.— Витамин. ресурсы и их использ., 1961, вып. 5, с. 133—144.
247. *Кэбот Е., Мейер М.* Экспериментальная иммунология.— М. : Медицина, 1968.— 230 с.
248. *Лабораторная техника органической химии* / Под ред. Б. Кейла.— М. : Мир, 1966.— 737 с.
249. *Лаврищева Т. Н., Витковская В. А., Мясина В. В. и др.* Влияние аэрации на биосинтез глюкозооксидазы грибом *Penicillium vitale* в погруженной культуре.— В кн.: Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Киев : Наук. думка, 1968, с. 152—154.
250. *Лазуревский Г. В., Терентьева И. В., Шамшурич А. А.* Практические работы по химии природных соединений.— М. : Высш. школа, 1966.— 335 с.
251. *Лакин Г. Ф.* Биометрия.— М. : Высш. школа, 1973.— 343 с.

252. Ламбина В. А. Краткие сообщения: IV съезд Венгер. микробиол. о-ва (Будапешт, 30 сент.— 3 окт. 1964 г.).— Вест. АН СССР, 1965, № 2, с. 95—96.
253. Ланецкий В. П., Филин-Колдаков Б. В., Поспелова Л. П. и др. Выявление грибной инфекции в растительных тканях методом люминесцентной микроскопии.— Микология и фитопатология, 1976, 10, вып. 6, с. 516—518.
254. Левина Л. Ш., Лебедева Е. И. Определение активности глюкозооксидазы экспресс-методом.— Науч.-техн. информ. Винодельч. пром-сть, 1966, вып. 4, с. 6—9.
255. Левитин М. М. Индуцированная изменчивость фитопатогенных грибов.— Микология и фитопатология, 1968, 2, вып. 1, с. 18—24.
256. Левитин М. М., Журавлев А. П. Об идентичности видов *Kabatella lini* и *Pullularia pullulans*.— Микология и фитопатология, 1971, 5, вып. 2, с. 115—120.
257. Левитин М. М., Захаров П. А. Летальный и мутагенный эффект на возбудителя полиспороза льна.— Генетика, 1967, № 9, с. 65—70.
258. Левитин М. М., Федорова И. В. Генетика фитопатогенных грибов.— Л.: Наука, 1972.— 215 с.
259. Левитин М. М., Шестопалос С. В. Типы спаривания и гибридизация штаммов *Drechslera* (*Helminthosporium*) *teres*.— Тр. Всесоюз. ин-та защиты растений, 1976, вып. 49, с. 27—29.
260. Ленинджер А. Биохимия.— М.: Мир, 1974.— 957 с.
261. Ли Д. Е. Действие радиации на живые клетки.— М.: Изд-во иностр. лит., 1955.— 288 с.
262. Лизак Ю. В., Сиверс В. С., Алексеева И. В. Метод определения целлюлазной активности у почвенных гифомицетов.— В кн.: Микробиологические и биохимические исследования почв. Киев: Урожай, 1971, с. 116—117.
263. Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов.— М.: Изд-во иностр. лит., 1953.— 531 с.
264. Литвинов М. А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов.— Л.: Наука, 1969.— 120 с.
265. Литвинов М. А., Дудка И. А. Методы исследования микроскопических грибов пресных и соленых (морских) водоемов.— Л.: Наука, 1975.— 150 с.
266. Лифшиц Д. Б. Методы определения активности промышленных ферментных препаратов.— М., 1971, с. 29—39.
267. Лифшиц Д. Б., Паценкер Е. С. Методы определения протеолитической активности ферментных препаратов.— В кн.: Химия протеолитических ферментов: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. по химии протеаз (Вильнюс, май 1973 г.). Вильнюс, 1973, с. 71—72.
268. Логинова Л. Г. Получение ферментов в условиях непрерывного культивирования.— В кн.: Микробиология. Т. 4. Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1975, с. 124—151. (Итоги науки и техники / ВИНТИ).
269. Логинова Л. Г., Ташпулатов Ж. Определение активности целлюлаз.— Микробиология, 1965, 32, № 5, с. 258—262.
270. Лозинов А. Б., Глазунова Л. М., Ермакова И. Т. Активность ферментов цитратного, глиоксилатного и пентозофосфатного циклов при росте дрожжей на гексадеканоле и на глюкозе.— Микробиология, 1976, 45, вып. 1, с. 33—39.
271. Лукомская И. С., Городецкий В. К. Применение микроцида (глюкозооксидазы) для специфического количественного определения

- глюкозы в крови.— *Вопр. мед. химии*, 1960, 6, вып. 6, с. 641—642.
272. *Лурье А. А.* Хроматографические материалы (справочник).— М. : Химия, 1978.— 440 с.
273. *Лурье А. М., Верховцева Т. П., Левитов М. М.* Управление процессом биосинтеза пенициллина.— В кн.: *Управление биосинтезом микроорганизмов*. Красноярск, 1973, с. 227—228.
274. *Львова Л. С., Кравченко Л. В., Шульгина А. П.* Хроматографический метод одновременного полуколичественного определения микотоксинов в зерне.— *Прикладная биохимия и микробиология*, 1979, 15, вып. 1, с. 143—149.
275. *Люблинская Л. А.* Определение протеолитической активности ферментных препаратов.— В кн.: *Химия протеолитических ферментов : Тез. докл. Всесоюз. симпоз. по химии протеаз (Вильнюс, май 1973 г.)*. Вильнюс, 1973, с. 72—74.
276. *Любшин А. А., Лазарев В. С.* Сравнительное действие токсических продуктов, полученных из грибов *F. sporotrichiella* и *F. rosea*.— В кн.: *Тр. Оренбург. отд-ния Всесоюз. о-ва физиологов*. Оренбург, 1960, с. 2.
277. *Лях С. П., Рубан Е. Л.* Фотопротекторное действие пигмента *Nadsoniella nigra*.— *Микробиология*, 1968, 37, вып. 5, с. 862—864.
278. *Малек И.* Роль непрерывных процессов и их изучение в развитии современной науки и в производстве.— В кн.: *Непрерывное культивирование микроорганизмов : Теорет. и методол. основы*. М. : Пищ. пром-сть, 1978, с. 9—28.
279. *Малиновский О. В.* Количественные закономерности пострадиационного восстановления клеток.— *Соврем. пробл. радиобиологии*, 1970, т. 1, с. 191—214.
280. *Марков К. И.* Методы определения роста и размножения бактерий.— В кн.: *Экспериментальная микробиология*. София : Медицина и физкультура, 1965, с. 284—303.
281. *Маттисон Н. Л., Низковская О. П., Сивочуб О. А.* Целлюлазная активность культуральных фильтратов окаймленного трутовика.— В кн.: *Продукты биосинтеза высших грибов и их использование*. М.; Л. : Наука, 1966, с. 21—27.
282. *Маттисон Н. Л., Фалина Н. Н., Пасскель Г. Г.* Активность целлюлозолитических ферментов культуральных фильтратов *Fomitopsis apposa* (Fr.) Karst. в зависимости от состава питательной среды.— В кн.: *Продукты биосинтеза высших грибов и их использование*. М.; Л. : Наука, 1966, с. 14—20.
283. *Маттисон Н. Л., Фалина Н. Н., Якимов П. А., Маслова Р. А.* Протеолитическая активность древоразрушающих грибов в связи с синтезом белка и биомассы.— В кн.: *Кормовые белки и физиологически активные вещества для животноводства*. М.; Л. : Наука, 1965, с. 33—38.
284. *Мауэр Г.* Диск-электрофорез.— М. : Мир, 1971.— 247 с.
285. *Медведева М. Н., Кугенев П. В., Щука В. П.* Применение метода хроматографии на бумаге для массового определения аминокислот.— *Лаб. дело*, 1961, № 9, с. 3—8.
286. *Медицинская микология и грибковые заболевания / Под ред. Л. Н. Машкиллейсона*.— Будапешт : Изд-во АН Венгрии, 1966.— 981 с.
287. *Мейер А., Зейтц Э.* Ультрафиолетовое излучение.— М. : Медгиз, 1960.— 270 с.

288. Мейнелл Д., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология.— М. : Мир, 1967.— 347 с.
289. Мейсель М. Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов.— М. : Изд-во АН СССР, 1950.— 369 с.
290. Мейсель М. Н. Флуоресцентная микроскопия и цитология в общей микробиологии.— Успехи микробиологии, 1971, 7, с. 32—66.
291. Мейсель М. Н., Гуткина А. В. Применение люминесцентной микроскопии для быстрого обнаружения патологических изменений в тканях и органах.— Докл. АН СССР, 1953, 3, № 91, с. 647—654.
292. Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот / Под ред. О. А. Семихатова.— Л. : Изд-во АН СССР, 1962.— 85 с.
293. Методические указания по выявлению и учету основных болезней сельскохозяйственных культур.— М. : Колос, 1975.— 54 с.
294. Методические указания по определению афлатоксина В₁ в зерне, продуктах его переработки и комбикормах / Разработ. А. Н. Леоновым.— М. : ВАСХНИЛ, 1973.— 14 с.
295. Методические указания по оценке устойчивости тыквенных культур к вирусам, бактериозу, оливковой пятнистости, фузариозному увяданию, антракнозу, мучнистой росе, коричневой гнили, аскохитозу, египетской заразихе.— М. : ВАСХНИЛ, 1970.— 43 с.
296. Методические указания по санитарно-микологическому исследованию кормов.— М. : Колос, 1969.— 27 с.
297. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. / Под ред. Н. А. Красильникова.— М. : Изд-во Моск. ун-та, 1966.— 216 с.
298. Методы фитопатологических и энтомологических исследований в селекции растений / Под ред. Ю. Н. Фадеева, А. А. Кузмичева.— М. : Колос, 1977.— 224 с.
299. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В. И. Билай.— Киев : Наук. думка, 1973.— 243 с.
300. Методы экспериментальной химиотерапии / Под ред. Г. Н. Першина.— М. : Медгиз, 1959.— 503 с.
301. Микотоксикозы человека и с/х животных / Под ред. В. И. Билай.— Киев : Изд-во АН УССР, 1960.— 168 с.
302. Микробиологические методы определения витаминов, аминокислот, антибиотиков.— М. : Колос, 1968.— 160 с.
303. Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот.— М. : Изд-во иностр. лит., 1954.— 306 с.
304. Милько А. А. Определитель мукооральных грибов.— Киев : Наук. думка, 1974.— 303 с.
305. Мироненко А. Д. Методы определения алкалоидов.— Минск : Наука и техника, 1966.— 120 с.
306. Мирчинк Т. Г. О грибах, обуславливающих токсичность дерново-подзолистой почвы различной степени окультуренности.— Микробиология, 1957, 26, № 1, с. 78—86.
307. Мирчинк Т. Г. Распространение грибов в почвах Памира.— Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1963, № 1, с. 199—204.
308. Мирчинк Т. Г. Почвенная микология.— М. : Наука, 1976.— 206 с.
309. Мирчинк Т. Г., Бондаревская Ф. Г. Фитотоксины почвенных сапрофитных грибов.— В кн.: Микроорганизмы в сельском хозяйстве. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1970, с. 312—323.
310. Михайлова Л. А., Квитко К. В. Лабораторные методы культивирования возбудителей бурой ржавчины пшеницы *Russinia secalis*

- ditaf. sp. tritici Rob. ex Desm.— Микология и фитопатология, 1970, 4, вып. 3, с. 269—273.
311. Муромцев Г. С., Зольникова Н. В., Боровков А. В. Использование хлореллы в качестве тест-объекта при выделении микроорганизмов, обладающих фитотоксической активностью.— Докл. ВАСХНИЛ, 1974, № 1, с. 2—3.
 312. Муромцев Г. С., Зольникова Н. В., Боровков А. В. Ряска как тест-объект для оценки фитотоксической активности почвенных микроорганизмов.— С.-х. биология, 1977, № 2, с. 227—230.
 313. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений.— М.: Мир, 1965.— 271 с.
 314. Наумов Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований.— М.; Л.: Сельхозгиз, 1937.— 272 с.
 315. Наумов Н. А. Анализ семян на грибную и бактериальную инфекцию.— М.; Л.: Сельхозгиз, 1951.— 137 с.
 316. Наумов Н. А., Козлов В. Е. Основы ботанической микротехники.— М.: Сов. наука, 1954.— 312 с.
 317. Начев Л., Гешева Р. Методы качественного определения витамина В₁₂, синтезированного актиномицетами на агаризованной питательной среде.— Микробиология, 1964, 33, № 4, с. 739—744.
 318. Нельсон Н., Шомодьи М. Определение целлюлозолитической активности у грибных продуцентов.— М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1945.— 211 с.
 319. Нефедов М. П., Кашкин А. П. О выращивании дерматофитов глубинным методом.— Вопр. микологии, 1976, вып. 11, с. 5.
 320. Низшие растения / Под ред. Л. В. Гарибовой, Н. П. Горбуновой, И. И. Сидоровой, Т. М. Сизовой.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1975.— 152 с.
 321. Никитин Д. И. Применение электронной микроскопии для изучения почвенных суспензий и культур микроорганизмов.— Почвоведение, 1964, № 6, с. 86—89.
 322. Никитин Е. Е., Звягин И. В. Замораживание и высушивание биологических препаратов.— М.: Колос, 1971.— 343 с.
 323. Николаева П. Л. Грибы. Ежевиковые грибы.— М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961.— 433 с.— (Флора споровых растений СССР; Т. 6).
 324. Никольская Е. А. Влияние способа подготовки и хранения посевного материала *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai на образование глюкозооксидазы и каталазы.— В кн.: Метаболиты почвенных микроорганизмов. Киев: Наук. думка, 1971, с. 82—102.
 325. Никольская Е. А. Культивирование грибов.— В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук. думка, 1973, с. 17—49.
 326. Нікольська О. О., Вакуленко В. О., Дегтяр Р. Г. та ін. Виробничий досвід одержання каталази *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai.— Мікробіол. журн., 1976, 38, № 4, с. 471—475.
 327. Нікольська О. О., Дегтяр Р. Г., Синявська О. І. та ін. Порівняльна характеристика утворення і властивостей каталаз та глюкозооксидази деяких видів грибів роду *Penicillium*.— Мікробіол. журн., 1975, 37, № 2, с. 169—175.
 328. Нікольська О. О., Кирилова Л. М., Синявська О. І. Утворення β-фруктофуранозидази *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai та іншими видами роду *Penicillium* Lk.— Мікробіол. журн., 1975, 37, № 5, с. 597—602.
 329. Нікольська О. О., Ясинчук Н. А. Природна мінливість *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai і характеристика активних варіантів

- гриба, що утворюють глюкозооксидазу.— Мікробіол. журн., 1977, 39, № 5, с. 601—609.
330. Новикова С. И., Бондарчук А. А., Василенко Г. Д. О начальных этапах расщепления сахарозы грибом *Cladosporium* sp.— Микробиология, 1970, 39, вып. 1, с. 35—41.
331. Новости систематики высших и низших растений.— Киев : Наук. думка, 1977.— 256 с.
332. Номенклатура ферментов : (Рекомендации Международ. биохим. союза по номенклатуре и классификации ферментов).— М. : Наука, 1966.— 252 с.
333. Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты.— М. : Изд-во иностр. лит., 1950.— 346 с.
334. Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. Получение кристаллических ферментов.— В кн.: Кристаллические ферменты. М. : Изд-во иностр. лит., 1950, с. 296—306.
335. Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов.— М. : Изд-во АН СССР, 1959.— 379 с.
336. Одум Ю. Основы экологии.— М. : Мир, 1975.— 740 с.
337. Олифсон Л. Е. Новые химические методы определения токсичности злаковых культур.— В кн.: Сообщ. о науч. работах членов Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. М. : Изд-во АН СССР, 1955, с. 2.
338. Опарин А. И., Бардинская М. С. Некоторые данные о механизме энзиматического действия инвертазы.— Докл. АН СССР, 1954, 94, № 3, с. 305—310.
339. Осипян Л. Л. Микрофлора Армянской ССР : Пероноспорные грибы.— Ереван : МИТК, 1967.— Т. 1. 255 с.
340. Основные методы фитопатологических исследований / Под ред. А. Е. Чумаковой.— М. : Колос, 1972.— 48 с.
341. Остапец Н. Г., Романская Н. Н. Практикум по биохимии.— Киев : Вища школа, 1974.— 251 с.
342. Панасенко В. И., Кленин В. И., Игнатов В. В. и др. Определение концентрации шаровидных бактерий в суспензии методом спектра мутности.— Прикл. биохимия и микробиология, 1973, 9, № 4, с. 604—608.
343. Парибок В. П. Природа пострадиационного восстановления. I. Определение и общая характеристика процесса.— В кн.: Защита и восстановление при лучевых повреждениях. М. : Наука, 1966, с. 20—25.
344. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот на хроматограммах при помощи реакции с нингидрином.— Биохимия, 1971, 19, вып. 6, с. 702—712.
345. Пат. 125028 (Дания). Apparat til fuldning af nærings-substrat i Petri-skåle med lag Dühring Ornløf.— Оpubл. в Б. И., 1973, № 18.
346. Пересыпкин В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология.— М. : Колос, 1974.— 560 с.
347. Перт С. Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток.— М. : Мир, 1978.— 331 с.
348. Перфильев Б. В., Габе Д. Р. Капиллярные методы изучения микроорганизмов.— М.; Л. : Изд-во АН СССР, 1961.— 534 с.
349. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии.— М. : Колос, 1968.— 496 с.
350. Петров К. П. Методы биохимии растительных продуктов.— Киев : Вища школа, 1978.— 220 с.

351. *Петрова И. А.* Методические указания по диагностике и защите риса от фузариозной корневой гнили.— Л. : Колос, 1976.— 22 с.
352. *Пешков А. П.* Руководство по микробиологии.— М. : Наука, 1962.— 246 с.
353. *Пидопличко Н. М.* Грибная флора грубых кормов.— Киев : Изд-во АН УССР, 1953.— 486 с.
354. *Пидопличко Н. М.* Пеницилли (ключи для определения видов).— Киев : Наук. думка, 1972.— 148 с.
355. *Пидопличко Н. М., Борисова В. Н., Двойнос Л. М.* О пероксидазной активности микофлоры опавших листьев и хвои.— В кн.: Пятый симпозиум микологов и лишенологов Прибалт. респ. (Вильнюс, 1968). Вильнюс, 1968, с. 132—135.
356. *Пидопличко Н. М., Борисова В. Н., Элланская И. А.* О пероксидазе у микромицетов.— В кн.: Экспериментальная микология. Киев : Наук. думка, 1968, с. 56—63.
357. *Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г.* Способы стерилизации питательных сред, посуды, инструментов, приборов.— В кн.: Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1971, с. 87—88.
358. *Пирс Э.* Гистохимия.— М. : Изд-во иностр. лит., 1962.— 962 с.
359. *Плешков Б. П.* Практикум по биохимии растений.— М. : Колос, 1968.— 183 с.
360. *Поволоцкая К. Л., Зайцева Н. И., Скоробогатова Е. П.* Флуорометрический метод определения рибофлавина.— Витамин. ресурсы и их использ., 1955, вып. 3, с. 108—120.
361. *Подвысоцкая О. Н., Кашкин П. Н.* Руководство по исследованию дерматомицетов.— Л. : Медгиз, 1931.— 110 с.
362. *Покровский А. А., Арчаков А. И.* Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций.— В кн.: Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.— М. : Медицина, 1968, т. 2, № 5, с. 5—59.
363. *Покровский А. А., Кравченко Л. В., Тютельян В. А.* Афлатоксины. — М., 1977.— 106 с.— (Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. Токсикология; Т. 8).
364. *Политов В. Ф.* Некоторые клинико-эпидемиологические данные о хронической трихофитии в Ленинграде и Белоруссии : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Л., 1971.— 14 с.
365. *Помощникова Н. А.* Микробиологический метод определения пантотеновой кислоты.— Витамин. ресурсы и их использ., 1955, вып. 3, с. 152—157.
366. *Пономаренко Ф., Скирта О., Малащенко Ю.* Досвід патоморфологічного аналізу токсичної дії дендродохіну на організм кролів та щурів.— Мікробіол. журн., 1961, 23, № 2, с. 15.
367. *Порк Н. И., Безбородов А. М.* Изучение грибов как продуцентов дезоксирибонуклеазы.— Биол. науки, 1972, № 4, с. 86—92.
368. *Починок Н.* Определение активности ферментов сахаразы и амилазы.— Бюл. физиологии, 1958, № 4, с. 42—44.
369. *Практикум по общей фитопатологии* / Под ред. П. Н. Головина, М. В. Арсеньева, А. Т. Тропова, В. Н. Шестиперова.— Л. : Колос, 1977.— 239 с.
370. *Практикум по сельскохозяйственной фитопатологии* / Под ред. К. В. Попковой.— М. : Колос, 1976.— 334 с.
371. *Препараты ферментные* : ГОСТ № 2433.— Введ. 29 окт. 1974 г.
372. *Прескот С., Дэн С.* Техническая микробиология. — М.: Изд-во иностр. лит., 1952.— 723 с.

373. *Проценко А. Е., Легункова Р. М.* Техника электронно-микроскопических исследований в фитопатологии.— М. : Изд-во АН СССР, 1962.— 48 с.
374. *Пухидская А. М.* Зрачковая реакция как метод определения токсичности злаков : Тез. докл. Всесоюз. совещ. по АТА (Москва, 1948). М., 1948, с. 20—23.
375. *Пятницкий Н. П., Пятницкий И. Н.* Определение пепсина и ренина в мг активного азота.— В кн.: Химия протеолитических ферментов : Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеиназ (Вильнюс, май 1973 г.). Вильнюс, 1973, с. 70—72.
376. *Работнова И. Л.* Исследования физиологического состояния микроорганизмов при непрерывном хеостатном культивировании.— В кн.: Микробиология. Т. 4. Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1975, с. 5—51. (Итоги науки и техники / ВИНТИ).
377. *Работнова И. Л., Иванова И. И.* Рост и развитие микробных культур.— Успехи микробиологии, 1971, 7, с. 68.
378. *Рагина-Трайнина С. Э., Одинцова И. Г.* Мучнистая роса злаков (пшеницы и ячменя).— В кн.: Генетика и селекция болезнеустойчивых сортов культурных растений. М. : Наука, 1974, с. 77—117.
379. *Радловська З. П.* Горизонтальний електрофорез на поліакриламідному гелі.— Укр. біохім. журн., 1970, 42, № 4, с. 524—526.
380. *Рассулин Ю. Л., Каверзнева Е. Д.* Метод определения протеиназ с окрашенным субстратом.— В кн.: Химия протеолитических ферментов : Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеиназ (Вильнюс, май 1973 г.). Вильнюс, 1973, с. 136—138.
381. *Рачинский В. В., Гапон Г. Б.* Хроматография в биологии.— М. : Изд-во АН СССР, 1963.— 252 с.
382. *Ржичица Я.* Непрерывные системы.— В кн.: Непрерывное культивирование микроорганизмов : Теорет. и методол. основы. М. : Пищ. пром-сть, 1968, с. 29—63.
383. *Родионова Н. А., Итомленските Н. Я.* Изучение ксиланазы плесневых грибов.— В кн.: Ферменты микроорганизмов. М. : Наука, 1973, с. 131—135.
384. *Родионова Н. А., Тиунова Н. А.* Определение активности отдельных ферментов целлюлазного комплекса.— В кн.: Ферментативное расщепление целлюлозы. М. : Наука, 1967, с. 46—57.
385. *Рожанская Т. И., Марголина Н. А., Москвичев Б. В.* Концентрирование протеолитических ферментов ультрафильтрационными методами.— В кн.: Химия протеолитических ферментов : Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеиназ (Вильнюс, май 1973 г.). Вильнюс, 1973, с. 29—31.
386. *Рокицкий П. Ф.* Основы вариационной статистики для биологов.— Минск : Техиздат, 1961.— 221 с.
387. *Романкова А. Г., Кобрина Ю. П.* Влияние спектрального состава света на грибы р. *Penicillium*.— Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. биологии, геологии и географии, 1954, № 7, с. 49—59.
388. *Ромейс В.* Микроскопическая техника.— М. : Изд-во иностр. лит., 1953.— 718 с.
389. *Роскин Г. И.* Микроскопическая техника.— М. : Сов. наука, 1967.— 447 с.
390. *Рубан Е. Л., Вербина Н. М., Буженко С. А. и др.* Биосинтез аминокислот микроорганизмами.— М. : Наука, 1968.— 293 с.
391. *Рубин Б. А., Ладыгина И. Е.* Энзимология и биология дыхания растений.— М. : Высш. школа, 1966.— 287 с.

392. Румянцева В. М. Действие глубокого охлаждения на бродящие клетки *Endomyces magnusii*.— В кн.: Реакция клеток на экстремальные воздействия. М.; Л. : Изд-во АН СССР, 1963, с. 54—65.
393. Рухляева А. П., Корчагина Г. Т. Определение активности пектолитических ферментов грибного происхождения интерферометрическим методом.— Прикл. биохимия и микробиология, 1973, 9, вып. 6, с. 922—927.
394. Рыбалкина А. В., Кононенко Е. В. Непосредственное наблюдение микофлоры в почвах модифицированным методом Холодного.— Микробиология, 1953, 22, № 4, с. 439—444.
395. Сазыкин Ю. О. Химические основы действия антибиотиков / Под ред. В. Л. Кретовича.— М. : Наука, 1965.— 261 с.
396. Салдадзе К. М. Ионообменные смолы.— М. : Изд-во АН СССР, 1959.— 55 с.
397. Самнер Дж. Б., Сомерс Г. Ф. Химия ферментов и методы их исследования.— М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1948.— 584 с.
398. Самойлова К. А. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку.— Л. : Наука, 1967.— 143 с.
399. Самсонов Г. В. Теоретические основы одноактных методов выделения и фракционирования ферментов.— В кн.: Ферменты микроорганизмов. М. : Наука, 1977, с. 39—55.
400. Саркисов А. Х. Микотоксикозы.— М. : Сельхозгиз, 1954.— 216 с.
401. Саркисов А. Х., Королева В. П., Квашнина Е. С., Грезин В. Ф. Диагностика грибных болезней (микозов и микотоксикозов) животных.— М. : Колос, 1971.— 144 с.
402. Сафязов Ж. Цитоморфологические особенности возбудителя вилта хлопчатника.— Ташкент : Фан, 1977.— 10 с.
403. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Анализ белков растений методом вертикального микроэлектрофореза в полиакриламидном геле.— Физиология растений, 1969, 16, вып. 2, с. 350—356.
404. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Метод электрофореза белков растений в синтетической среде — полиакриламидном геле.— Физиология растений, 1964, 11, вып. 1, с. 147—153.
405. Сафонова М. Ю., Островский Д. Н., Гельман Н. С. Состав белков мембран *Micrococcus lysodeikticus*.— Биохимия, 1971, 36, вып. 5, с. 977—980.
406. Сборник методик по генетике микроорганизмов / Под ред. Р. Клауса и У. Хейса.— М. : Медицина, 1970, 248 с.
407. Северин В. А., Грачева И. В., Горская С. В. Баланс и обмен аминного азота у *Act. streptomycini* в процессе роста и развития.— Вопр. мед. химии, 1958, 4, вып. 6, с. 455—463.
408. Сиверс В. С. Определение целлюлаз и ксиланаз грибов.— В кн.: Методы экспериментальной микологии. Киев : Наук. думка, 1973, с. 102—110.
409. Сидорова И. И. Обзор современных взглядов на систематику гифомицетов.— Микология и фитопатология, 1967, 1, вып. 6, с. 453—463.
410. Сизова Т. П. Об устойчивости штаммов пенициллов при длительной культуре.— Микробиология, 1949, 18, вып. 6, с. 533—544.
411. Скрябин Г. К. Научные учреждения в США по изысканию и изучению антибиотиков.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1959, № 6, с. 935—943.
412. Словарь-справочник фитопатолога / Под ред. П. Н. Головина.— Л. : Колос, 1967.— 384 с.

413. *Смирнов А. М.* Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре.— М. : Наука, 1970.— 455 с.
414. *Смит К., Хэнеуолт Ф.* Молекулярная фотобиология.— М. : Мир, 1972.— 272 с.
415. *Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.*— М. : Медицина, 1964.— 348 с.
416. *Сойфер В. Н.* Молекулярные механизмы мутагенеза.— М. : Наука, 1969.— 511 с.
417. *Сокурова Е. Н.* Возникновение радиоустойчивости у микроорганизмов.— Успехи соврем. биологии, 1962, 53, № 1, с. 69—84.
418. *Сомбатхэй Д., Надь И., Курц М. и др.* Прибор для электрофореза в полиакриламидном геле и набор реактивов.— Будапешт, 1969.— 36 с.
419. *Спесивцева Н. А.* Микозы и микотоксикозы животных.— М. : Сельхозгиз, 1960.— 455 с.
420. *Спесивцева Н. А.* Микозы и микотоксикозы.— М. : Колос, 1964.— 551 с.
421. *Степанов В. М., Лавренева Г. И., Славинская М. М.* Аффинная хроматография кислых протеиназ.— В кн.: Химия протеолитических ферментов : Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеаз (Вильнюс, 1973 г.). Вильнюс, 1973, с. 28—30.
422. *Степанов А. А., Барышков Ю. А.* Применение тонкослойной хроматографии для изучения аминокислотного спектра спермальной плазмы человека.— Лаб. дело, 1971, № 4, с. 202—204.
423. *Стрешинский М. О.* Стимулирующее действие пенициллина на образование биологически активных веществ культурой *Bacillus subtilis*.— Микробиология, 1949, 18, вып. 5, с. 416—424.
424. *Стронгин А. Я., Левин Е. Д.* Использование диск-электрофореза и ИЭФ для исследования кислых протеиназ.— В кн.: Химия протеолитических ферментов : Материалы Всесоюз. симпоз. по химии протеаз (Вильнюс, май 1973 г.). Вильнюс, 1973, с. 29—31.
425. *Струговщикова Л. П.* Порівняльна оцінка методів визначення флавінів у клітинах дріжджів.— В кн.: Збірник робіт аспірантів. Львів : Вид-во Льв. ун-ту, 1963, с. 19—21.
426. *Стэкмен Э., Харрар Д.* Основы патологии растений.— М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1959.— 540 с.
427. *Супрун Т. П.* О хранении микроскопических грибов в стерильной почве.— Микробиология, 1965, 34, вып. 3, с. 539—545.
428. *Сушкин Н. Г.* Электронный микроскоп.— М. : Сов. наука, 1949.— 272 с.
429. *Татаренко Е. С., Высоцкая М. А.* О хранении плесневых грибов.— Микробиология, 1960, 29, вып. 4, с. 606—610.
430. *Татаренко Е. С., Іголкина Е. В., Манько В. Г.* Вплив умов зберігання на життєздатність грибів.— Мікробіол. журн., 1976, 68, № 2, с. 176—179.
431. *Терентьев И. В., Ростова Н. С.* Практикум по биометрии.— Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1977.— 152 с.
432. *Тимофеев-Ресовский Н. В., Иванов В. И., Корогодин В. И.* Применение принципа попадания в радиобиологии.— М. : Атомиздат, 1968.— 228 с.
433. *Тульчинский Н. И.* Фотоколориметрический метод определения лактозы и сахарозы при совместном присутствии.— Журн. прикл. химии, 1956, 29, № 6, с. 23—25.
434. *Тутельян В. А.* Механизм действия некоторых микотоксинов.— В кн.: Микотоксины : Тез. докл. симпоз. по микотоксинам (Оренбург, 28—30 сент. 1977 г.). Оренбург : Юж. Урал, 1977, с. 11—12.

435. *Удельнова И. М.* О цитофизиологических особенностях дрожжевых организмов после глубокого охлаждения и оттаивания.— Журн. общ. биологии, 1957, 18, № 5, с. 395—401.
436. *Уильямс В., Уильямс Х.* Физическая химия для биологов.— М. : Мир, 1976.— 598 с.
437. *Ульянищев В. И.* Микофлора Азербайджана : Пероноспоровые грибы.— Баку : Изд-во АН АзССР, 1967.— Т. 4. 352 с.
438. *Уоллен Л., Стодола Ф., Джексон Р.* Типовые реакции ферментативной химии.— М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1962.— 406 с.
439. *Успенская Ж. В., Кретович В. Л.* Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге.— В кн.: Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1962, с. 43—58.
440. *Утенков М. Д.* Микрогенерирование.— М. : Сов. наука, 1941.— 152 с.
441. *Уэтли Д.* Ферментативный катализ.— М. : Мир, 1972.— 268 с.
442. *Файбич М. М., Егоров В. И., Писаревский Ю. С.* О выживаемости микроорганизмов при замораживании.— Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1962, № 5, с. 68—72.
443. *Фалунина З. Ф., Мелькина Г. М., Роечко Т. Ф.* Методы определения сахаров, применяемые в пищевой промышленности.— М. : Наука, 1972.— 84 с.
444. *Федько П. А., Удовиченко Ю. М.* Сохранение жизнеспособности гриба *Stachybotrys alternans* при длительном хранении.— В кн.: Исследования в области ветеринарии. Одесса, 1975, с. 98—101.
445. *Фениксова Р. В., Тиунова Н. А., Родионова Н. А.* Определение активности целлюлазы.— В кн.: Методы современной биохимии. М. : Наука, 1975, с. 23—28.
446. *Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А.* Практикум по общей биохимии.— М. : Просвещение, 1975.— 318 с.
447. *Фихте Б. А., Гуревич Г. А., Кудрявцев А. А.* Дезинтеграция микроорганизмов.— В кн.: Микробиология. М. : Наука, 1978, с. 7—94. (Итоги науки и техники / ВИНТИ; Т. 8).
448. *Фишер Р. А.* Статистические методы для исследователей.— М. : Госстатиздат, 1958.— 2 с.
449. *Флор Х. Х.* Генетическое регулирование взаимодействий хозяина и паразита при болезнях, вызываемых ржавчинными грибами.— В кн.: Проблемы и достижения фитопатологии. М. : Урожай, 1962, с. 149—159.
450. *Фостер Д.* Химическая деятельность грибов.— М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1950.— 651 с.
451. *Фрей-Вислинг А.* Сравнительная органеллография цитоплазмы.— М. : Мир, 1976.— 114 с.
452. *Хазиев Ф. Х.* Ферментативная активность почвы.— М. : Наука, 1976.— 177 с.
453. *Хакимова Л. К., Мочалкин А. И.* Электронно-микроскопическое изучение внедрения гриба *Phytophthora infestans* D. в клетки листьев картофеля.— Микология и фитопатология, 1970, 4, вып. 3, с. 239—241.
454. *Халабуда Т. В.* Грибы рода *Mortierella* Coemans.— М. : Наука, 1973.— 208 с.
455. *Харченко С. М.* Антибіотичні властивості препаратів дендродохіну проти різних видів дріжджів.— Мікробіол. журн., 1968, 30, № 5, с. 425—427.

456. Харченко С. М., Лемещенко Г. П. Антибіотичні властивості видів роду *Penicillium* проти сажкових грибів.— Мікробіол. журн., 1969, 31, № 6, с. 668—670.
457. Харченко С. М. Ідентифікація антибіотиків з пеніцилліїв проти збудників плямистості листя та сажки.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 1, с. 115—119.
458. Хмель И. А. Регуляция скорости роста и связанные с ней перестройки клеток микроорганизмов.— М. : Наука, 1970.— 85 с.
459. Хмельницкий О. К. Гистологическая диагностика поверхностных и глубоких микозов.— Л. : Медицина, 1973.— 180 с.
460. Хомутовский О. А., Никольская Е. А., Гудкова Л. В. Ультраструктура *Penicillium vitale* Pidopl. et Bilai — продуцента каталазы и глюкозооксидазы.— Мікробіол. журн., 1977, 39, № 6, с. 696—702.
461. Хохряков М. К. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов.— Л. : Всесоюз. ин-т защиты растений, 1969.— 68 с.
462. Хроматография на бумаге / Под ред. И. М. Хайса, К. Мацека.— М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1962.— 851 с.
463. Циммер К. Г. Проблемы количественной радиобиологии.— М. : Госатомиздат, 1962.— 99 с.
464. Цыперович А. С. Ферменты.— Киев : Техніка, 1971.— 354 с.
465. Чаговец Р. В., Лахно Е. В. Коферментные витамины и коферменты.— Витамины, 1974, вып. 7, с. 3—11.
466. Частухин В. Я., Николаевская М. А. Биологический распад и ресинтез органических веществ в природе.— Л. : Наука, 1969.— 323 с.
467. Черняк В. Я., Забоева Н. А., Гаврилова Е. М. Измерение молекулярного веса белков в аналитической ультрацентрифуге «дифференциально-краевым» методом.— Биохимия, 1971, 36, вып. 5, с. 985—992.
468. Черонис Н. Микро- и полумикрометоды органической химии.— М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1960.— 521 с.
469. Чеснокова М. П., Бондарев Ф. Н. Флуорохромирование ядер дрожжевых клеток акридин-ипритом.— Микробиология, 1965, 44, № 2, с. 367—369.
470. Чумаков А. Е., Минкевич И. И., Власов Ю. И., Гаврилова Е. А. Основные методы фитопатологических исследований.— М. : Колос, 1974.— 191 с.
471. Шабадаш А. Л. Рациональная методика гистохимического обнаружения гликогена и ее теоретическое обоснование.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1947, № 6, с. 745—760.
472. Шапиро Д. К. Практикум по биологической химии.— Минск : Вышэйшая школа, 1976.— 286 с.
473. Швайкова М. Д. Судебная химия (химико-токсикологический анализ).— М. : Медицина, 1965.— 475 с.
474. Шевчик В. Применение некоторых микрометодов при использовании новых антибиотиков.— Микробиология, 1959, 28, вып. 1, с. 47—50.
475. Шемаханова Н. М., Олейников Р. Р. Электрофорез белков клеток *Rhizobium* и образование ими клубеньков.— Докл. АН СССР, 1971, 200, № 5, с. 1240—1243.
476. Шербухин Б. Д., Миронова Л. И., Кондырева А. В., Грюнер В. О. Определение глюкозы в патоке глюкозооксидазным методом с использованием ферроцианида калия.— Прикл. биохимия и микробиология, 1970, 6, № 4, с. 467—469.

477. Шкидченко А. Н., Литвиненко Л. А., Яровицина Э. Н. Влияние коэффициента заполнения и интенсивности аэрации на массообмен лабораторных ферментов.— Прикл. биохимия и микробиология, 1973, 9, № 5, с. 791—794.
478. Шлегель Г. Общая микробиология.— М. : Мир, 1972.— 476 с.
479. Шмотина Г. Е. Методы хранения грибов, ассимилирующих углеродороды.— Микология и фитопатология, 1975, 9, № 4, с. 349—350.
480. Шорин В. А., Россолимо О. К., Кудрина Е. С. О методах изыскания антибиотиков, обладающих противовирусным действием.— Антибиотики, 1956, 1, № 1, с. 15—19.
481. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях.— М. : Мир, 1965.— 498 с.
482. Юнусов М. Ю. Методы определения токсичности кормов, пораженных некоторыми видами грибов.— Тр. ВНИИ вет. санитарии, 1969, 32, с. 76—83.
483. Эйдус Л. Х. Физико-химические основы радиобиологических процессов и защиты от излучений.— М. : Атомиздат, 1972.— 240 с.
484. Элиашвили В. И., Лойцянская М. С. Влияние источников углерода и рН питательной среды на левансахаразную активность *Glucanobacter ohydans* Л-1.— Прикл. биохимия и микробиология, 1977, 13, вып. 1, с. 11—15.
485. Элпидина О. К. К этиологии септической ангины и методике определения ядовитости зерна.— В кн.: Алиментарная токсическая алейкия / Под ред. проф. Малкина.— Казань, 1945, с. 78—82.
486. Ярмоненко С. П. Радиобиология человека и животных.— М. : Высш. школа, 1977.— 368 с.
487. Яровенко В. Л. Основные закономерности непрерывного спиртового и ацетонобутилового брожения.— М. : Пищ. пром-сть, 1975.— 101 с.
488. Яровенко В. Л., Воробьева Л. А., Яровенко В. В. Теория и практика получения продуктов брожения при непрерывном культивировании микроорганизмов.— В кн.: Микробиология : Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1975, с. 76—106. (Итоги науки и техники / ВИНТИ; Т. 4).
489. Яровенко В. Л., Калунянц К. А., Голгер Л. И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий.— М. : Пищ. пром-сть, 1970.— 443 с.
490. Ячевский А. А. Основы микологии. Посмертное издание под ред. Н. А. Наумова—М. ; Л. / Гос. изд-во колх. и совх. лит-ры, 1933.— 1039 с.
491. Ainsworth G. C. Dictionary of the fungi.— 6-th ed.— New York; London : Acad. press, 1971.— 463.
492. Ainsworth G. C., Sussman A. S. The fungal cell.— New York; London : Acad. press, 1965.— Vol. 1, 575—598.
493. Anastasion C. J., Churchland L. M. Fungi on decaying leaves in marine habitats.— Can. J. Bot., 1969, 47, N 1, p. 251—257.
494. Anderzejczuk-Hybel J., Bartoszewicz K., Kaczkowski J., Kulawski M. et al. Wplyw przechowywania szczepow *Aspergillus* na stabilność syntezy glukoamylazy.— Prz. ferm. i roln., 1977, 21, N 6, p. 18—20.
495. Annelis A., Koch R. R. Comparative resistance of strains of *Clostridium botulinum* to gamma rays.— Appl. Microbiol., 1952, 10, N 4, p. 326—330.

496. *Aredi L. H., McKinley W. P.* Zebra fish eggs and larvae as aflatoxin bioassay test organisms.— *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1968, 51, N 7, p. 902—904.
497. *Aronson I. M.* The cell wall.— In: *The fungi* / Ed. G. C. Ainsworth, A. S. Sussman. New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1, p. 49—76.
498. *Arx G. A. von.* The ontogeny of fungus spore.— *Nat. J. Plant Pathol.*, 1970, 76, N 3, p. 147—151.
499. *Atwood K. C., Norman A.* On the interpretation of multihit survival curves.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1949, 35, N 12, p. 696—709.
500. *Badcock E.* New methods in the cultivation of wood-rotting fungi.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1941, 25, N 2, p. 200—205.
501. *Badcock E.* Methods for obtaining fructifications of wood-rotting fungi in culture.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1943, 24, N 1, p. 127—132.
502. *Baglioni T.* Qualche considerazione sulla pathologia da microcistine.— *Zootecn. avicomic.*, 1977, 17, N 11, p. 28—36.
503. *Bakerspiegel A.* Soil as a storage medium for fungi.— *Mycologia*, 1953, 45, N 4, p. 596—604.
504. *Bakerspiegel A.* A further report on the soil storage of fungi.— *Mycologia*, 1954, 46, N 5, p. 680.
505. *Baliga B., Krishwamur K., Rajagopalan R. et al.* A simple method for desalting biological fluids for chromatography.— *J. Indian. Inst. Sci.*, 1955, 37, N 1, p. 18—21.
506. *Baranowski T., Niederland T. R.* Aldolase activity of myogen A.— *J. Biol. Chem.*, 1949, 180, N 2, p. 543—551.
507. *Barnett H. L., Lilly V. G.* The effect of color of light on sporulation of certain fungi.— *Proc. West Virginia Acad. Sci.*, 1952, 24, N 1, p. 60—64.
508. *Barron G. L.* The genera of Hyphomycetes from soil.— Baltimore : Williams and Wilkins co., 1968.— 364 p.
509. *Bartnicki-Garcia.* Microbiological differentiation.— *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1973, 23, N 2, p. 245—268.
510. *Bavendamm W.* Über das vorkommen und Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen.— *Z. Pflanzenkrankh.*, 1928, 38, N 2, S. 257—276.
511. *Batko A.* *Larys hydromycologii.*— Warszawa : WN, 1975.— 478 p.
512. *Bennet P. A., Sullivan J. W., Walsh A. A.* Simple protein meter.— *Anal. Biochem.*, 1970, 31, N 1, p. 127—129.
513. *Bent K. J.* Electrophoresis of protein of *Penicillium* species on acrylamide gels.— *J. Gen. Microbiol.*, 1967, 49, N 2, p. 195—200.
514. *Bergter F.* Kinetic model of mycelial growth.— *Z. allg. Mikrobiol.*, 1978, 18, N 2, p. 143—145.
515. *Bessey F. A.* Morphology and taxonomy of fungi.— Philadelphia : Acad. press, 1950.— 327 p.
516. *Binder F. L., Barnett H. L.* Enzymes for carbohydrate catabolism in the mycoparasite *Tieghemiomyces parasiticus*.— *Mycologia*, 1973, 65, N 5, p. 999—1006.
517. *Blumenthal H. I.* Carbohydrate metabolism.— In: *The fungi* / Eds G. C. Ainsworth, A. S. Sussman. New York; London : Acad press, 1965, vol. 1 p. 229—269.
518. *Bomar M. T.* Chemische sterilisation. Die Möglichkeiten der Entkeimung des Fermentationsmediums mit wasserstoff-peroxid.— *Lebensmitteltechnik*, 1976, 8, N 11, S. 650—654.

519. *Bonner W. D.* Succinic dehydrogenase.— In: *Methods in enzymology* / Eds S. R. Colowick, N. O. Kaplan. New York : Acad. press, 1955, vol. 1, p. 722—729.
520. *Bonomi V., Vechioni R.* Applicazioni della isatina nella chromatographia su carta olegli aminoacidi.— *Bull. Soc. ital., biol. Sperim.*, 1959, 35, N 25, p. 210—211.
521. *Boosalis M. G.* Precocious sporulation and longevity of conidia of *Helminthosporium sativum* in soil.— *Phytopathology*, 1962, 52, N 11, p. 1172—1177.
522. *Booth T.* Problematical taxonomic criteria in the Chytridiales: comparative morphology of 10 *Entophlyctis* sp. isolates.— *Can. J. Bot.*, 1971, 49, N 7, p. 917—987.
523. *Borrow A., Brian P. W., Chester V. E. et al.* Gibberelic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi* : some observations on its production and isolation.— *J. Sci. Food and Agr.*, 1955, 6, N 3, p. 340—378.
524. *Borrow A.* The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture.— *Can. J. Microbiol.*, 1961, 7, N 2, p. 227.
525. *Brandl E.* Über toxische Schimmelpilz metaboliten in Milch und Milchprodukten.— *Wien. tierarztl. Monatsschr.*, 1976, 63, N 5, S. 166—171.
526. *Bradley D. E.* Techniques for electron microscopy.— Oxford : Oxford press, 1961.— 180 p.
527. *Buell C. B., Weston W. H.* Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures.— *Amer. J. Bot.*, 1947, 34, N 10, p. 555—561.
528. *Bu Lock I. D.* Regulation of 6-methyl-salicylate and patulin synthesis in *Penicillium urticae*.— *Can. J. Microbiol.*, 1964, 15, N 3, p. 279.
529. *Bu Lock I. D.* Aspects of secondary metabolism in fungi.— In: *Biogenesis of antibiotic substances*. Pragma, 1965, p. 61—71.
530. *Burges A., Nicholas D. P.* Use of soil selections in studying amount of fungal hyphae in soil.— *Soil Sci.*, 1961, 92, N 1, p. 82—86.
531. *Burt W. R., Cazin Y.* Production of extracellular ribonuclease by yeast and yeast-like fungi and its repression by orthophosphate in species of *Cryptococcus* and *Tremella*.— *J. Bacteriol.*, 1976, 125, N 3, p. 955—960.
532. *Butler G. M.* Growth of hyphal branching systems in *Coprinus disseminatus*.— *Ann. Bot. N. Y.*, 1961, 25, N 7, p. 341—352.
533. *Byrde R. W.* The chemical environment of fungal growth — In: *The fungi* / Eds G. C. Ainsworth, A. S. Sussman.— New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1, p. 525—537.
534. *Caldwell I. V., Trinci A. P. J.* The growth unit of the mould *Geotrichum candidum*.— *Arch. Mikrobiol.*, 1973, 88, N 1, p. 1—10.
535. *Campbell A.* Special growth techniques (synchrony, chemostatic).— In: *The fungi* / Eds G. C. Ainsworth, A. S. Sussman.— New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1, p. 647—654.
536. *Carlile M. J.* The photoresponses of fungi.— In: *Photobiology of microorganisms*. New York; London : Acad. press, 1970, p. 310—344.
537. *Cejp K.* Houby.— Praha : Nakladatelstvi ČSAV, 1958.— 425 s.
538. *Cejp K.* Houby. Flora ČSR. I. Oomycetes.— Praha : Naklad. ČSAV, 1959.— 475 s.
539. *Chang L. O., Srb A. M., Steward F. C.* Electrophoretic separation of the soluble proteins of *Neurospora*.— *Nature*, 1962, 193, N 4817, p. 756—759.

540. *Chesters C. G. C.* A method of isolating soil fungi.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1940, **24**, N 4, p. 352—355.
541. *Cholodny N. G.* Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora.— *Arch. Mikrobiol.*, 1930, **1**, N 1, S. 31.
542. *Christensen M., Whittengham W. F.* The soil microfungi of open bogs and conifer swamps in Wisconsin.— *Mycologia*, 1965, **47**, N 6, p. 882—896.
543. *Clutterbuck A. J., Raper J. A.* A direct determination of nuclear in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*.— *Genet. Res.*, 1966, **7**, N 2, p. 185—194.
544. *Cocker R., Greenshields R. N.* Design for laboratory scale tower fermenters.— *Lab. Pract.*, 1975, **26**, N 5, p. 341—343.
545. *Constantin J.* Les mucédinées simples. Paris. Dong B. Contribution à l'étude taxonomique des Hyphomycetes (Deuteromycetes). I. Esquisse d'une nouvelle classification.— *Česka mycol.*, 1972, **26**, N 3, s. 155—166.
546. *Constantinides A., Rai V. R.* Application of the continuous maximum principle to fermentation processes.— In: *Biotechnol. and bioeng. Symp.* New York. etc.: Willey, 1974, vol. 4, pt 2, p. 663—680.
547. *Cooke W. B.* Terminology of the Fungi imperfecti.— *Mycopathol. et mycol. appl.*, 1974, **53**, N 1, p. 45—67.
548. *Corner E. J. N.* Variation in the size and shape of spores, basidia, cystidia in Basidiomycetes.— *New Phytol.*, 1947, **46**, N 2, p. 195—228.
549. *Corner E. J. N.* Studies in the basidium. 1. The ampoule effect.— *New Phytol.*, 1948, **47**, N 1, p. 22—51.
550. *Corner E. J. N.* Monograph of *Clavaria* and allied genera.— Oxford: Oxford press, 1950.— 740 p.
551. *Corner E. J. N.* The classification of the higher fungi.— *Proc. Cinn. Soc.*, London, 1953, **165**, N 1, p. 4—6.
552. *Corner E. J. N.* Monograph of *Thelephora* (Basidiomycetes).— *Nova Hedwigia*, 1968, **27**, Lehre Bein, p. 1—110.
553. *Corner E. J. N.* Studies in the basidium: Spore-spacing and the *Boletus* spore.— *Gard. Bull. Singapore*, 1972, **26**, N 1, p. 159—192.
554. *Cronin D. A., Ward M. K.* The characterization of some mushroom volatiles.— *J. Sci. Food and Agr.*, 1971, **22**, N 5, p. 477—479.
555. *Cundell A. M., Mucller W. C., Traxler R. W.* Morphology and ultrastructure of a *Penicillium* sp. grown on n-hexadecan or peptone.— *Appl. and Environ Microbiol.*, 1976, **31**, N 3, p. 408—414.
556. *Cunningham L. H.* Hyphal systems as aids in identification of species and genera of the Polyporaceae.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1954, **37**, N 1, p. 44—50.
557. *Curtis C. R.* Photoinduced perithecial formation by *Nectria haematococca* on media containing either l-tyrosine, l-phenylalanine or D-glucose + NaNO_3 as sole carbon and nitrogen sources.— *Can. J. Microbiol.*, 1969, **15**, N 8, p. 863—868.
558. *Curtis C. R.* Comparison of UV induced delay in germination in pigmented and pigment-inhibited conidia of *Aspergillus carbonarius*.— *Radiat. Bot.*, 1970, **10**, N 2, p. 125—130.
559. *Dade H. A.* Laboratory methods in use the culture collection CMI Herb. IMI handbook.— In: *Methods in use at the Commonwealth mycological institute.* London: Acad. press, 1971, p. 40.
560. *Davis B. J.* Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, **121**, N 2, p. 402—427.

561. *Day P. R., Anagnostakis S. L.* Corn smut dikarion in culture.— *Nat. New Biol.*, 1971, 231, N 1, p. 19—20.
562. *Dijkstra J. J.* Submerged cultures of Mushroom mycelium as sources of protein and flavour compounds.— Delft : Pergamon press, 1976.— 106 p.
563. *Dinoor A., Person C.* Genetic complementation in *Ustilago gordei*.— *Can. J. Bot.*, 1969, 47, N 1, p. 9—14.
564. *Dixon G. H., Kornberg H. L.* Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle.— *Biochem. J.*, 1959, 72, N 1, p. 195.
565. *Doebbler G. F., Rinfret A. P.* Survival of microorganisms after ultrarapid freezing and thawing.— *J. Bacteriol.*, 1963, 85, N 2, p. 485.
566. *Donald H. M., William J. D.* Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage.— *Can. J. Microbiol.*, 1971, 22, N 3, p. 338—341.
567. *Dong B.* Contribution a l'etude taxonomique des Hyphomycetes (Deuteromycetes). 1. Esquisse d'une nouvelle classification. *Ceska mycol.*, 1972, 26, N 3, p. 155—166.
568. *Dorrel W. W., Page R. M.* The use of fragmented mycelium in the culture fungi.— *J. Bot.*, 1947, 53, N 3, p. 360—361.
569. *Drysdale I. W.* Isoelectric focusing in polyacrylamide gel.— In: *Methods of protein separation*. New York; London: Plenum press, 1975, vol 1, p. 13—126.
570. *Duggan D. E., Anderson A. W., Elliker P. R.* Inactivation of the radiation-resistant sporlage bacterium *Micrococcus radiodurans*. 1. Radiation inactivation rates in three meat substrates and in buffer.— *Appl. Microbiol.*, 1963, 2, N 5 p. 398—403.
571. *Durand R.* Influence des radiations luminescences sur le processus de reproduction des champignons.— *Mycopathologia*, 1976, 60, N 1, p. 3—16.
572. *Durrell L. W., Shields L. M.* Fungi isolated in culture from soils of the Nevada Test Site.— *Mycologia*, 1961, 43, N 4, p. 636—641.
573. *Edwards D. C., Wiseman A.* Novel shock-tube cell disruptor.— *Process Biochem.*, 1971, 6, N 11, p. 32—34.
574. *Ellis M. B.* Dematiaceous Hyphomycetes.— London : Commonwealth Mycol. Inst., 1971.— 608 p.
575. *Ellman G. L.* Tissue sulphhydryl groups.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1959, 82, N 1, p. 70—77.
576. *Emerson R.* An experimental study of the life cycle and taxonomy of *Allomyces*.— *Lloydia*, 1941, 4, N 1, p. 77—144.
577. *Emerson R.* The growth phase in *Neurospora* corresponding to the logarithmic in phase in unicellular organisms.— *J. Bacteriol.*, 1950, 60, N 1, p. 221—223.
578. *Emerson R.* Mycological organization.— *Mycologia*, 1958, 50, N 4, p. 589—621.
579. *Enari T. M., Markkanen P.* Production of cellulolytic enzymes by fungi.— *Adv. Chem. Eng.*, 1977, 5, N 1, p. 1—24.
580. *Escoula L.* Moisissures des ensilages et conséquences toxicologique.— *Fourrages*, 1977, 69, N 1, p. 97—114.
581. *Fahim M. M.* The effect of light and other factors on the sporulation of *Aternaria porri*.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1966, 49, N 1, p. 73—78.
582. *Fennell D. I., Raher K. B., Flickinger M. H.* Further investigations on the preservation of mold cultures.— *Mycologia*, 1950, 42, N 1, p. 135—147.
583. *Fitzpatrick H. M.* The lower fungi. Phycomycetes.— New York; London : McGraw Hill Book co, 1931.— 331 p.

584. *Flora R. M., King K. M.* Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1965, 5, N 3, p. 439.
585. *Floss H. G.* Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds.— *Tetrahedron*, 1976, 32, N 5, p. 873—912.
586. *Ford J. E., Holdsworth E. S.* An improved bioautographic technique.— *Biochem. J.*, 1953, 53, N 3, p. 22—23.
587. *Fraikin G. J., Pospelov M. E., Rubin L. B.* Phytochrome system of the yeast *Candida guilliermondii* and recovery from ultraviolet injury.— *J. Gen. Microbiol.*, 1976, 95, N 1, p. 27—30.
588. *Fries L.* Studies in the physiology of *Coprinus*. 1. Growth substance, nitrogen and carbon requirements.— *Sven. bot. tidskr.*, 1955, 49, N 4, p. 475—535.
589. *Fries N.* Growth factor requirements of some higher fungi.— *Sven. bot. tidskr.*, 1950, 44, N 3, p. 379—386.
590. *Fuerst R., Wagner R. P.* An analysis of the free intracellular amino acids of certain strains of *Neurospora*.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1957, 70, N 2, p. 311—326.
591. *Fujimoto M., Kuniaka A., Yoshino H.* Distribution of P_i type nuclease in the genus *Penicillium*.— *Agr. and Biol. Chem.*, 1977, 41, N 7, p. 1125—1131.
592. *Fulton H. R., Cobentz W. W.* The fungicidal action of ultraviolet radiation.— *Agr. Res.*, 1929, 38, N 3, p. 159—168.
593. *Gale M. W., Schmith C. G., Bromfield K. R.* Cryogenic storage of conidia of *Sclerospora sorghi*.— *Phytopathology*, 1975, 65, N 7, p. 828—829.
594. *Gäumann E.* Pflanzliche Infektionslehre.— Basel : Birkhäuser, 1946.— 347 S.
595. *Gäuman E.* Über Fusarinsäure als Welketoxin.— *Phytopathol. Z.*, 1957, 29, N 1, S. 1—44.
596. *Gäumann E.* The mechanisms of fusaric acid injury.— *Phytopathology*, 1958, 48, N 12, p. 4465.
597. *Giegler A., Lillehoy E. B.* Mycotoxins.— *Adv. Appl. Microbiol.*, 1968, 10, p. 155—219.
598. *Ginnis Mc M. R., Padhyal A. A., Ajello L.* Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water.— *Appl. Microbiol.*, 1974, 28, N 2, p. 218—222.
599. *Goodall R. R.* Miniature thin-layer chromatography: a rapid technique with optional spot evaluation by densitometry.— *J. Chromatogr.*, 1972, 73, N 1, p. 161—172.
600. *Goos R. D., Davis E. E., Butterfield W.* Effect of warming rates on the viability of frozen fungus spores.— *Mycologia*, 1967, 59, N 1, p. 58—66.
601. *Greene G. L.* Enzymes of glucose catabolism pathways in *Colletotrichum* and *Gloeosporium*.— *Mycologia*, 1969, 61, N 5, p. 902—914.
602. *Gregory P. H.* Fungus spores.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1952, 35, N 1, p. 1—18.
603. *Grove S. N., Bracker C. E., Morre D. J.* An ultrastructure basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*.— *Amer. J. Bot.*, 1975, 59, N 2, p. 245—266.
604. *Gunter C. E., Kohn H. J.* The effect of X-rays on the survival of bacteria and yeasts.— *J. Bacteriol.*, 1956, 71, N 5, p. 571—581.
605. *Hägoö R. M.* Designation of physiological races of plant pathogenes.— *Nature*, 1970, 201, N 5264, p. 1268—1269.

606. *Hall R., Lentmyer G. A., Erwin D. C.* Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamide gelelectrophoresis of proteins.— *Phytopathology*, 1969, 59, N 6, p. 770—774.
607. *Halliwell G. J., Riaz M.* Interactions between components of the cellulase complex of *Trichoderma koningii* on native substrates.— *Arch., Mikrobiol.*, 1971, 78, N 4, p. 295.
608. *Harding V. J., McLean R. M.* A colorimetric method for the estimation of amino acid nitrogen. 2. Application to the hydrolysis of proteins by pancreatic enzymes.— *J. Biol. Chem.*, 1916, 24, N 2, p. 503—517.
609. *Hardreaves A. J., Fox R. A.* Survival of *Fusarium avenaceum* in soil.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1977, 69, N 3, p. 425—428.
610. *Harley J. L., Waid J. S.* The effect of light upon the roots of seech and its surface population.— *Plant and Soil*, 1955, 7, N 1, p. 23—28.
611. *Haskins R. H., Anastasion J.* Comparisons of the survival of *Aspergillus niger* spores lyophylized by various methods.— *Mycologia*, 1953, 45, N 4, p. 523—532.
612. *Hastie A. C.* Hybridization of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*.—*Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1973, 60, N 3, p. 511—523.
613. *Hasunuma K., Ishikawa T.* Control of the production and partial characterization of repressible extracellular 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, 480, N 1, p. 178—193.
614. *Hesseltine C. W.* Mycotoxine research in India.— *Mycopathologia*, 1976, 58, N 3, p. 157—163.
615. *Hesseltine C. W., Bradle B. I., Benjamin C. K.* Further investigations on the preservation of molds.— *Mycologia*, 1960, 52, N 5, p. 762—774.
616. *Hesseltine C. W., Shotwell O. L., Ellis J. J., Stubblefield R. D.* Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*.— *Bacteriol. Revs*, 1966, 30, N 4, p. 795—805.
617. *Hildebrandt W., Durner K., Weide H.* Vergleichende Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung einiger Enzyme bei Hefenstämmen nach Wachstum.— *Z. allg. Mikrobiol.*, 1972, 12, N 1, S. 15—18.
618. *Hinshelwood C. N.* The chemical kinetics of the bacterial cell.— Oxford : Glaredon press, 1952.— 243 p.
619. *Hiroshi S.* Electronic absorbtion spectra and geometry of organic molecules.— London : Acad. press, 1967.— 440 p.
620. *Hohnel F. von.* System der Fungi imperfecti mykologische.— Untersuchung. und Beichte von Dr. R. Falck, 1923, 1, N 3, S. 301—369.
621. *Hollaender A., Emmons E. W.* Induced mutation and speciation in fungi.— *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1949, 11, N 1, p. 78—84.
622. *Holliday R.* A new method for identification of biochemical mutants of microorganisms.— *Nature*, 1956, 178, N 4540, p. 987.
623. *Hooker A. L., Garwood C. E.* Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*.— *Phytopathology*, 1966, 56, N 5, p. 536—539.
624. *Hughes S. J.* Conidiophores, conidia and classification.— *Can. J. Bot.*, 1953, 31, N 5, p. 577—659.
625. *Humfeld H.* The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture.— *Science*, 1948, 107, N 3, p. 373—378.
626. *Humfeld H., Sugihara T. F.* Mushroom mycelium production by submerged propagation.— *Food Technol.*, 1949, 3, N 10, p. 355—356.

627. *Humfeld H., Sugihara T. F.* The nutrients requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture.— *Mycologia*, 1952, **44**, N 5, p. 605—620.
628. *Hwang S. W.* Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration.— *Appl. Microbiol.*, 1966, **14**, N 5, p. 784—788.
629. *Hwang S. W.* Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. 1. An evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures.— *Mycologia*, 1968, **60**, N 3, p. 613—621.
630. *Hwang S. W., Howells A.* Investigations of ultra-low temperature for fungal cultures. 2. Cryoprotection afforded by glycerol and dimethyl sulphoxide to 8 selected fungal cultures.— *Mycologia*, 1968, **60**, N 3, p. 622—626.
631. *Ishitani C.* A high frequency of heterozygous diploids and somatic recombination produced by ultraviolet light in imperfecti fungi.— *Nature*, 1956, **178**, N 4535, p. 706.
632. *Jagger J.* Photoreactivation.— *Bacteriol. Revs.*, 1958, **22**, N 2, p. 99—142.
633. *Jensen Donald E., Shurman Marvin C.* The mini-ferm chemostat.— *J. Phys. E : Sci. Instrum.*, 1972, **5**, N 12, p. 1148—1149.
634. *Johnson T. W.* The genus *Achlia* : morphology and taxonomy.— *Ann. Arbor : Univ. Michigan press*, 1956.— 180 p.
635. *Johnson T. W., Jr., Ferchau H. A., Gold H. S.* Isolation, culture, growth and nutrition of some lignicolous marine fungi.— *Phyton*, 1959, **1**, N 1, p. 65—80.
636. *Johnson L. F., Osborne T. S.* Survival of fungi in soil exposed to γ -radiation.— *Can. J. Bot.*, 1964, **42**, N 1, p. 105—113.
637. *Johnson T. W., Jr., Sparrow F. K., Jr.* Fungi in oceans and estuaries.— *New York : Hafner publ. co*, 1961.— 668 p.
638. *Joly P. A.* Recherches sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. 3. Action de la lumière et de ultra-violets.— *Rev. Mycol.*, 1962, **27**, N 1, p. 1—16.
639. *Jones E. B. G.* Aquatic fungi.— In: *Methods in microbiology* / Ed. C. Booth.— *London : Acad. press*, 1971, vol. 4, p. 335—365.
640. *Jorgensen E., Veibly K.* A new polyphenol oxydase test.— *Physiol. plant.*, 1953, **6**, N 3, p. 533—537.
641. *Joshi L. M., Wilcoxson K. D., Gera S. D. et al.* Preservation of fungi cultures in liquid air.— *Indian J. Exp. Biol.*, 1974, **12**, N 6, p. 598—599.
642. *Kallela K., Korpinen E.* The quantity and estrogenic activity of F-2 toxin produced on different substrates.— *Nord. veterinärmed.*, 1973, **25**, N 9, p. 446—450.
643. *Kalyanasundaram R.* Studies on an antagonism of the phytotoxin fusaric acid.— *Phytopathol. Z.*, 1960, **38**, N 3, S. 16—18.
644. *Kalyanasundaram R., Saraswathi-Devi L.* Line in the metabolism of *Fusarium vasinfectum* ATK.— *Nature*, 1955, **175**, N 4465, p. 945.
645. *Katz D., Goldstein D., Rosenberger R. F.* Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters.— *J. Bacteriol.*, 1972, **109**, N 5, p. 1097—1100.
646. *Kaweraw E., Wieland T.* Amino acid chromatograms.— *Nature*, 1951, **168**, N 4275, p. 77—79.
647. *Kellerman T. S., Pienaar J. G., van der Westhuizen G. C. A. et al.* A highly fatal tremorgenic mycotoxicosis of Cattle caused by *Aspergillus clavatus*.— *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1976, **43**, N 3, p. 147—154.

648. *Kern H.* Die Verteilung der radioaktiven Fusarinsäure in Tomaten-sprossen.— *Phytopathol. Z.*, 1975, 30, N 1, S. 31—37.
649. *Kertesz L.* The pectic substances.— New York: Intersci. publ. Inc., 1951.— Vol. 1. 159 p.
650. *King K. W.* Endweise degradation of cellulase.— In: *Advances in the enzymatic hydrolysis of cellulose and related materials*. New York; London: Pergamon press, 1963.— 159 p.
651. *Koch W.* Untersuchungen über Myceliumwachstum und Fruchtkörperbildung bei einigen Basidiomyceten (*Polystictus versicolor*, *Polyporus annosus*, *Pleurotus ostreatus*, *Psalliota bispora*).— *Arch. Mikrobiol.*, 1958, 30, N 4, S. 409—432.
652. *Kohlmeyer J.* The importance of the fungi in the sea.— In: *Symp. marine microbiol.* Springfield, 1963, p. 300—314.
653. *Kohlmeyer J.* Ecological observations on arenicolous marine fungi.— *Z. allg. Mikrobiol.*, 1966, 6, N 1, S. 95—106.
654. *Kohlmeyer J.* Intertidal and phycophilous fungi from Tenerife (Canary Islands). — *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1967, 50, N 1, p. 137—147.
655. *Kohlmeyer J.* Deterioration of wood by marine fungi in the deep sea.— In: *Materials perforans and Deep Sea of American Society for testing and materials special technological publication*.— N. Y.: Acad. press, 1969a, p. 20—30.
656. *Kohlmeyer J.* Marine fungi from Hawaii including the new genus *Heliascus*.— *Can. J. Bot.*, 1969b, 47, N 10, p. 1469—1487.
657. *Kotlaba F., Pouzar Z.* Preliminary results of the staining of spores in cotton blue.— *Fed. Rep.*, 1964, 69, N 1, p. 131—142.
658. *Kreisel H.* Grundzüge eines natürlichen system der Pilze.— Jena: Fischer, 1969, S. 5—245.
659. *Krogh P.* The Pathology of Mycotoxicoses.— *J. Stored Prod. Res.*, 1969, vol. 5, p. 259—264.
660. *Kühner R., Romagnesi H.* Flore analytique des champignons superieurs (*Agaricus*, *Boletus*, *Chantarellus*).— Paris: Masson et Cie, 1953.— 556 p.
661. *Kulik M. M., Brooks A. G.* Electrophoretic studies of soluble proteins from *Aspergillus* sp. — *Mycologia*, 1970, 62, N 2, p. 365—376.
662. *Kuo-Huang Ling, Birne W. L., Lardy H.* Phosphohexokinase.— In: *Methods in enzymology* / Ed. S. R. Colowick, N. O. Kaplan.— New York: Acad. press, 1955, vol. 1, p. 306—310.
663. *Lakshminarayanan K., Subramanian D.* Is fusaric Acid a vivotoxin?— *Nature*, 1955, 176, N 4484, p. 697—698.
664. *La Touche.* Slide-traps for soil fungi.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1948, 31, N 4, p. 281—284.
665. *Leach Ch. M.* The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*.— *Mycologia*, 1963, 55, N 2, p. 151—164.
666. *Leach Ch. M.* Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi.— *Can. J. Bot.*, 1965, 43, N 2, p. 185—200.
667. *Leach Ch. M.* Practical Guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi.— In: *Methods in microbiology* / Ed. A. Booth.— New York; London: Acad. press, 1971, vol. 4, p. 609—664.
668. *Leach Ch. M., Trione E. J.* Action for light-induced sporulation of the fungi *Pleospora herbarum* and *Alternaria dauci*.— *Photochem. and Photobiol.*, 1966, 5, N 5, p. 621—630.

669. *Leal J. A., Gomez-Miranda B.* The effect of light and darkness on the germination of the oospores of certain species of *Phytophthora* on some synthetic media.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1965, **48**, N 3, p. 491—495.
670. *Leath K. T., Romig R. W., Rowell J. B.* A system for storing rust spores in liquid nitrogen.— *Phytopathology*, 1966, **56**, N 5, p. 570.
671. *Lechner J. F., Fuscaldo K. E.* Studies on colonial mutants of *Neurospora crassa*.— *Bacteriol. Proc.*, 1968, p. 143.
672. *Lee D. E., Salaman M. H.* Inactivation of vaccinia virus by radiation.— *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1942, **23**, N 1, p. 27—31.
673. *Levis N. T., Kumita U. S.* Evidence for extreme UV-resistance of *Micrococcus* sp.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, **47**, N 5, p. 1100—1105.
674. *Lhoas P.* Growth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine.— *Genet. Res.*, 1968, **12**, N 3, p. 305—315.
675. *Lichtwardt R. W.* The Trichomycetes: what are their relationships? — *Mycologia*, 1973, **65**, N 1, p. 1—20.
676. *Lilly V. G.* Elemental constituents and their roles.— In: *The fungi* / Eds G. C. Ainsworth, A. Sussman.— New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1, p. 163—178.
677. *Little G. N., Gordon M. A.* Survival of fungus cultures maintained under mineral oil twelve years.— *Mycologia*, 1967, **59**, N 4, p. 733—736.
678. *Lowry O. H., Rosbraigh N. J., Farr A. L. et al.* Protein measurement with the folinphenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, N 2, p. 265—275.
679. *Lyman J., Fleming R. H.* Composition of sea water.— *J. Mar. Res.*, 1940, **3**, N 1, p. 134—146.
680. *Lyr H.* Untersuchungen über peroxydasen höher Pilze.— *Planta*, 1956, **48**, N 2, S. 239—265.
681. *Lyr H.* Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm Reaktion.— *Planta*, 1958, **50**, N 3, S. 359—370.
682. *Lyr H.* On the toxicity of oxidized polyphenols.— *Phytopathol. Z.*, 1965, **52**, N 3, p. 229—240.
683. *Madelin M. F.* Studies on the nutrition of *Coprinus lagopus* Fr., especially as affecting fruiting.— *Ann. Bot.*, 1956, **17**, N 20, p. 307—330.
684. *Maitland C. C.* Mechanism of cellulase action.— *Nature*, 1965, **207**, N 4992, p. 27.
685. *Malca I., Erwin D. C., Sims J. J. et al.* Respiratory and Enzymatic studies with *Verticillium albo-atrum* from cotton.— *Phytopathology*, 1968, **58**, N 3, p. 348—353.
686. *Malencon G.* Le development des spore chez les Phylactéries.— *Bull. Soc. mycol. France*, 1958, **74**, N 11, p. 423—435.
687. *Mandels G. R.* Kinetics of fungal growth.— In: *The fungi* / Ed. G. C. Ainsworth, A. S. Sussman.— New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1.— 599 p.
688. *Mandels M., Reese E. T.* The production of cellulases.— *Develop. Ind. Microbiol.*, 1964, **5**, p. 5.
689. *Mandels M., Reese E. T.* Resolution of cellulase complex of *Trichoderma viride*.— *Develop. Ind. Microbiol.*, 1964, **5**, p. 25.
690. *Mandels M., Weber J.* The production of cellulases.— *Adv. Chem.*, 1969, **95**, N 2, p. 391.

691. *Manier J. F., Lichtwardt R. W.* Revision de la systématique des Trychomycetes.— Ann. Sci. Nat. Bot., Ser., 1968, 9, N 12, p. 519—632.
692. *Martin J. P.* Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi.— Soil Sci., 1950, 69, N 2, p. 215—232.
693. *McCarty M., Sullivan M.* A new and highly specific colorimetric test for methionine. — J. Biol. Chem., 1941, 141, N 2, p. 871—973.
694. *McDonald W. C.* Heterothalism in *Pyrenophora teres*.— Phytopathology, 1963, 53, N 7, p. 771—773.
695. *McGrath R.* Protein measurement by ninhydrin determination of amino acids related by alkaline hydrolysis.— Anal. Biochem., 1972, 49, N 1, p. 95—102.
696. *Meixner A.* Chemische Farbreaktionen von Pilzen.— Vaduz : Cramer, 1975.— 286 S.
697. *Melin E.* Mycorrhiza. Handbuch der Pflanzenphysiologie.— Encycloped. Plant Physiol., 1959, 11, N 5, p. S. 605—638.
698. *Melzer V., Zvara J.* Česke Holubinsky.— Arch. prirodov vyzkum čech., 1927, 17, N 1, p. 126.
699. *Metzenberg R. L.* A gene affecting the Repression of invertase and trehalose in *Neurospora*.— Arch. Biochem. and Biophys., 1962, 96, N 3, p. 468—474.
700. *Meyer J. A., Rehard L.* Protein and esterase patterns of two formal speciales of *Fusarium oxysporum*.— Phytopathology, 1969, 59, N 10, p. 1409—1411.
701. *Meyers S. P.* Marine fungi in Biscayne Bay, Florida.— Bull. Mar. Sci. Gulf and Caribbean, 1953, 2, p. 590—601.
702. *Meyers S. P., Kohlmeyer J.* *Varicosporina ramulosa* gen. nov., sp. nov., an aquatic hyphomycete from marine areas.— Can. J. Bot., 1965, 43, N 7, p. 915—921.
703. *Meyers S. P., Reynolds E. S.* Effects of wood and wood products on perithecial development by lignicolous marine Ascomycetes.— Mycologia, 1959, 51, N 1, p. 138—145.
704. *Meyers S. P., Reynolds E. S.* Occurence of lignicolous fungi in Northern Atlantic.— Can. J. Bot., 1960, 38, N 2, p. 217—226.
705. *Micola P.* Growing forest soil Basidiomycetes in pure culture.— Kurtziana, 1955, N 3, p. 5—16.
706. *Miller C. E.* Observation concerning taxonomic characteristic in chytridiaceous fungi.— J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 1968, 84, N 1, p. 100—107.
707. *Mitchell J. P.* Combined protein and DNA-measurements in plant cells using the dinitrofluorobenzene and Feulgen technigues.— J. Rev. Microscop. Soc., 1967, 87, N 3/4, p. 375—381.
708. *Modess O.* Zur Kenntnis der Mykorrhizabildner von Kiefer und Fichte.— Symp. bot. upsäl., 1941, 5, N 1, S. 1—147.
709. *Molitoris H. P.* Identification of *Agaricus campestris* strain (NRRL 2334, 2335, 2336) as *Beauveria tenella* (Lelacroix, Seim).— Nature, 1962, 194, N 4823, p. 316.
710. *Monod J.* Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.— Paris, 1942.
711. *Moore R. F., McAlleer J. H.* The fine structure of Mycota. 7. Observation on septa of Ascomycetes and Basidiomycetes.— Amer. J. Bot., 1962, 49, N 1, p. 86—94.
712. *Moreau C.* Quelques manifestations de mycotoxicooses nouvelles

- on pen connues en France. — Rec. med. vet., 1974, 150, N 1, p. 17—26.
713. *Moseley B. E. B., Copland H. J. R.* Involvement of recombination Repair function in disciplined cell division of *Micrococcus radiodurans*.— J. Gen. microbiol., 1975, 36, N 2, p. 343—357.
 714. *Moustafa A. M.* Nutrition and the development of mushroom flavor in *Agaricus campestris* mycelium.— Appl. Microbiol., 1960, 8, N 1, p. 63—67.
 715. *Muelier K. E., Durrell L. W.* Sampling tubes for soil fungi.— Phytopathology, 1957, 47, N 2, p. 243.
 716. *Nicholas D. I. D.* Utilization of inorganic nitrogen compounds and amino acids by fungi.— In: The fungi / Eds G. C. Ainsworth, A. S. Sussman.— New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1, p. 349—376.
 717. *Nicholas D. P., Parkinson D., Burges N. A.* Studies of fungi in a podzol.— Soil. Sci., 1965, 16, N 2, p. 258—269.
 718. *Nisizawa K.* Mode of the action of cellulases.— J. Ferm. Technol., 1973, 51, N 4, p. 267.
 719. *Nobles M.* Identification of wood-inhabiting Basidiomycetes.—Can. J. Bot., 1965, 43, N 9, p. 1097—1139.
 720. *Ogino C.* An improved procedure for paper chromatographic determination of amino acids.— J. Tokyo Univ. Fish., 1959, 43, N 1, p. 7—11.
 721. *Onions A. H. S.* Preservation of fungi.— In: methods in microbiology / Ed. H. Booth.— New York; London : Acad. press, 1971, vol. 4, p. 113—151.
 722. *Ornston L. M., Ornston M. K.* Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12.— J. Bacteriol., 1969, 98, N 3, p.1098—1108.
 723. *Paden J. W.* A centrifugation technique for separating ascospores from soil.— Mycopathol. et mycol. appl., 1967, 33, N 3/4, p. 382—384.
 724. *Papavizas G. C.* Survival of rootinfecting fungi in soil.— Phytopathology, 1967, 57, N 11, p. 1242—1246.
 725. *Parikh I., Cuatrecasas P.* Affinity chromatography, principles and applications.— In: Methods of protein separation. New York; London : Plenum press, 1975, vol. 1, p. 255—281.
 726. *Parmeter J. R., Jr., Hood J. R.* Use of ultraviolet light in isolation of certain fungi from soil.— Phytopathology, 1962, 52, N 4, p. 376—377.
 727. *Parvin R.* Citrate synthase from yeast.— In: Methods in enzymology / Ed. J. M. Lowenstein.— New York; London : Acad. press, 1969, vol. 13, p. 16—19.
 728. *Pegler D. N., Young T. W. K.* Basidiospore morphology in the Agaricales.— Nova Hedwigia, 1971, N 35, Beih., p. 1—210.
 729. *Perkins D. D.* Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. — Can. J. Microbiol., 1962, 8, N 4, p. 591—594.
 730. *Perlmann D.* Carbon sources.— In: The fungi / Eds G. C. Ainsworth, A. S. Sussman.— New York; London : Acad. press, 1965, vol. 1, p. 479—490.
 731. *Perreau-Bertrand J.* Recherces sur la differentiation et la structure de porai sporale chez les Homobasidiomycetes a spores ornées.— Ann. Sci. Nat. Bot. Ser., 1967, 8, N 12, p. 639—746.
 732. *Person L. H.* A method of maintaining viability and ability to spo-

- ulate in isolates of Ascochyta.— *Phytopathology*, 1961, **51**, N 11, p. 797—798.
733. *Pertot E., Puc A., Kremser M.* Lyophilization of nonsporulating strains of the fungus *Claviceps*.— *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 1977, **4**, N 4, p. 289—294.
 734. *Pilát A.* Flora ČSR : Gastromycetes.— Praha : Nakladatelství, 1958.— 862.
 735. *Pirt S. J.* A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi.— *J. Gen. Microbiol.*, 1967, **47**, N 1, p. 181—197.
 736. *Pirt S. J.* Microbial growth.— In: 19th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge, 1969, N 9, p. 199—216.
 737. *Pirt S. J.* Microbial growth and product formation.— In: 19th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge, 1969, N 10, p. 199—221.
 738. *Pirt S. J., Callow D. S.* Studies on the growth of *Penicillium chrysogenum* in continuous flow culture with reference to penicillin production.— *J. Appl. Bacteriol.*, 1960, **23**, N 1, p. 87—98.
 739. *Pirt S. J., Righelato R. C.* Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by *Penicillium chrysogenum* in bath and chemostat cultures.— *Appl. Microbiol.*, 1967, **15**, N 6, p. 1284.
 740. *Plankett B. E.* Nutritional and other aspects of fruit body production in pure cultures of *Collybia velutipes* (Curt.) Fr.— *Ann. Bot.*, 1953, **76**, N 17, p. 193—217.
 741. *Plombey N. Y. B.* Formation of the colony in the fungus *Chaetomium*.— *Austral. J. Biol. Sci.*, 1959, **12**, N 1, p. 53—64.
 742. *Pomper S. A., Atwood K. C.* Radiation studies on fungi.— *Radiat. Biol.*, 1955, **2**, N 3, p. 431—453.
 743. *Pope C. G., Stevens M. F.* The determination of amino nitrogen using copper method.— *Biochem. J.*, 1939, **33**, N 6, p. 1070—1077.
 744. *Popenoe H., Eno Ch.* The effect of gamma radiation on the microbial population of the soil.— *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1962, **26**, N 2, p. 164—167.
 745. *Porter C., Margolis D., Sharp P.* Quantitative determination of amino acid by paper chromatography.— *Contr. Thomp. Inst.*, 1957, **18**, p. 465—476.
 746. *Puhalla J. E., Mayfield J. E.* The mechanism of heterocariotic growth in *Verticillium dahliae*.— *Genetics*, 1974, **76**, N 3, p. 411—412.
 747. *Raper K. B., Thom C.* A manual of the *Penicillia*.— Baltimore, 1949.— 875 p.
 748. *Recent advanced in aquatic mycology* / Ed. E. B. G. Jones.— London : Elek Sci., 1976.— 749 p.
 749. *Reese E. T.* Enzymatic hydrolysis of cellulose.— *Appl. microbiol.*, 1956, **4**, N 1, p. 39—45.
 750. *Reese E. T., Siu R. G. U., Levinson U. S.* The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis.— *J. Bacteriol.*, 1950, **59**, N 3, p. 485—497.
 751. *Reijnders A. F. M.* Des problèmes du développement des carpophores des Agaricales et de quelques groupes voisins.— In: Uitgeverij. Den Haag, 1963, p. 1—412.
 752. *Reiss J.* Staining mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*.— *Stain. Technol.*, 1969, **44**, N 1, p. 5—9.
 753. *Reusser F., Spencer J. F. T., Sallans H. R.* Protein and fat content of some mushrooms grows in submerged culture.— *Appl. Microbiol.*, 1958, **6**, N 1, p. 1—4.

754. *Richardson L. T.* A simple culture tube closure method or prevention of contamination by air-borne fungi and mites.— *Phytopathology*, 1975, **65**, N 7, p. 833—834.
755. *Righelato R. C., Trinci A. P. J., Pirt S. J., Peat A.* The influence, of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*.— *J. Gen. Microbiol.*, 1968, **50**, N 3, p. 399—412.
756. *Robinson R. A.* Horizontal resistance.— *Rev. Plant. Pathol.*, 1973, **52**, N 8, p. 483—501.
757. *Roper J. A.* Production of heterozygous diploids in filamentous fungi.— *Experientia*, 1952, **8**, N 1, p. 14.
758. *Rushizky G. W., Whitlock J. P., Jr.* Preparation and Properties of a new DNase from *Aspergillus oryzae*.— *Biochemistry*, 1977, **16**, N 14, p. 3256—3261.
759. *Rusmin S., Ko Swan Djien.* Rice-grown *Rhizopus oligosporus* inoculum for tempeh fermentation.— *Appl. Microbiol.*, 1974, **28**, N 3, p. 347—350.
760. *Saccardo P. A.* *Sylloge Fungorum*. Vol. 4. *Hyphomycetes*.— Padua, 1886.
761. *Samborski D. J., Forsyth F. R., Person C.* Metabolic changes in detached wheat leaves floated on benzimidazole, and the effects of these changes on rust reaction.— *Can. J. Bot.*, 1958, **36**, N 5, p. 591—601.
762. *Sansing G. A., Davis N. D., Diener U. L.* Rapid method for preparation cell-free extracts of *Aspergillus ochraceus*.— *Appl. Microbiol.*, 1975, **29**, N 2, p. 300—302.
763. *Sarachek A., Grelaud L.* Phylogenetic distribution in yeast of the capacities for photoreactivation and temperature sensitive dark recovery following inactivation by ultraviolet radiation.— *Can. J. Microbiol.*, 1970, **16**, N 12, p. 1187—1198.
764. *Schaeffer J., Moeller F.* Beitrag zur Psaliota Forschung.— *Ann. Mycol.*, 1938, **36**, N 1, p. 64—82.
765. *Schultz J.* Zur Bedeutung des Schimmelpilzbefalls von Futtermitteln.— *Monatsh. Veterinarmed.*, 1972, **27**, N 15, S. 568—572.
766. *Semerdzieva M.* Pestovani a morfologicka pozorovani nekterich hub čeledi Agaricaceae in vitro.— *Česka mycol.*, 1965, **19**, N 4, p. 230—239.
767. *Sewell G. W. F.* A slide-trap method for the isolation of soil fungi.— *Nature*, 1956, **171**, N 4307, p. 708.
768. *Sharma V. D., Wilson R. F., Williams L. E.* Reproductive performance of female swine fed corn naturally molded or inoculated with *Fusarium roseum* Ohio isolates B and C.— *J. Anim. Sci.*, 1974, **38**, N 3, p. 598—602.
769. *Shields J., Durrell L. M., Sparrow A. H.* Preliminary Observations on radiosensitivity of algae and fungi from soils of the Nevada Test Site.— *Ecology*, 1961, **42**, N 2, p. 440—441.
770. *Shreeve B. J., Patterson D. S. P., Roberts B. A.* Investigation of suspected cases of mycotoxicosis in farm animals in Britain.— *Vet. Rec.*, 1975, **97**, N 15, p. 275—278.
771. *Shweet R.* The quantitative determination of proline and pipercolic acid with ninhydrin.— *J. Biol. Chem.*, 1954, **208**, N 2, p. 603—616.
772. *Simonart P., Kwang Vu Chow.* Etude de metabolisme d'acides amines chez *Aspergillus oryzae*.— *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. and Serol.*, 1953, **19**, N 3, p. 245—255.

773. *Singer R.* The Agaricales (Mushroom) in modern taxonomy. Lilloa. | 1951, 22, p. 1—832.
774. *Singer R.* The Agaricales in modern taxonomy.— 2nd ed. Weinheim : Cramer, 1962. 915 p.
775. *Singer R.* The Agaricales in modern taxonomy.— Vaduz : Cramer, 1975.— 912 p.
776. *Smith J. L., Valenzuela-Perez J., Ng W. S.* Changes in activities of the Embden-Meyerhof-Parnas and Pentose phosphate pathways during the growth cycle of *Aspergillus niger*.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1971, 57, N 1, p. 93—101.
777. *Somodgy M.* Effect of insulin hypoglycemia on alimentary hyperglycemia.— J. Biol. Chem., 1952, 193, N 19, p. 195.
778. *Sparrow F. K.* Aquatic Phycomycetes.— 2nd ed.— Ann. Arbor : Univ. Michigan press, 1960.— 1187 p.
779. *Stakman E. C., Levine M. N.* The determination of biologic forms of *Puccinia graminis* on *Triticum* spp.— Minn. Agr. Exp. St., Technol. Bull., 1922, N 8, p. 38—41.
780. *Stakman E. C., Levine M. N., Loegering W. A.* Identification of physiologic races of *Puccinia graminis tritici*.— U. S. Dep. Agr. Bur. Entomol. Plant Quarant. E., Buxton, 1944, p. 617.
781. *Stotzky G., Mortensen J. L.* Effect of gamma radiation on growth and metabolism of microorganisms in an organic soil.— Soil. Sci. Soc. Amer. Proc., 1959, 23, N 2, p. 125—127.
782. *Stulblefield R. D., Shotwell O. L.* Production of aflatoxin on wheat and oats measurement with a recording densitometer.— Appl. Microbiol., 1967, 15, N 1, p. 186.
783. *Subramanian C. V.* Hyphomycetes. An Account of Indian species, except *Cercosporae*.— New Dehli : Indian Council Agricult. Res., 1971.— 930 p.
784. *Sugihara T. F., Humfeld H.* Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom.— Appl. Microbiol., 1954, 2, N 1, p. 170—172.
785. *Sugimori T., Ogama Y., Omici T.* Studies on Basidiomycetes. 1. Production of mycelium and fruit body from noncarbohydrate organic substances. — J. Ferm. Technol., 1971, 49, N 5, p. 435—446.
786. *Suhara I.* The nucleases from *Acrecyllindrium* sp. III. General properties and specificity of endonuclease.— J. Biochem., 1973, 73, N 5, p. 1023—1032.
787. *Sundman Ch.* Succinate thiokinase from pig heart.— In: Methods in enzymology / Ed. J. M. Lowenstein.— New York; London : Acad. press, 1969, vol. 13, p. 62—69.
788. *Sussman A. S., Halvorson H. O.* Spores, their dormancy and germination.— New York; London : Harper and Row publ., 1966.— 354 p.
789. *Svoboda D., Grady H. J.* Aflatoxin B₁ injury in rat and monkey liver.— Amer. J. Pathol., 1967, 49, N 6, p. 1023—1051.
790. *Szuecs I.* Pat. 2761261 (CIIA). Mushroom culture.
791. *Szuecs I., Jonkers N. G.* Pat. 2858841 (CIIA). Method of growing mushroom mycelium and the resulting products.
792. *Tabak H. H., Cooke W. B.* Growth and metabolism of fungi in an atmosphere of nitrogen.— Mycologia, 1968, 60, N 1, p. 115—140.
793. *Takachashi J., Shunsaku H., Koji K.* Thermal death of fungal conidia in liquid paraffin.— J. Ferm. Technol., 1975, 38, N 10, p. 713—721.

794. *Takenaka A., Takenaka O., Mizota T. et al.* Sodium trichloroacetate as denaturation reagent for proteins.— *J. Biochem.*, 1971, 70, N 1, p. 63—76.
795. *Tan K. K.* Interraction of near-ultraviolet blue, read and far-red light in sporulation of *Botrytis cinerea*.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1975, 64, N 2, p. 215—222.
796. *Tchola O., Horecker B. L.* Transaldolase.— In: *Methods in enzymology* / Ed. W. A. Wood.— New York; London : Acad. press, 1966, vol. 9, p. 499—505.
797. *Teng C.* Studies on the biology of macrofungi with reference to their cultivation.— *Acta bot. sinica*, 1966, 14, N 2, p. 150—179.
798. *The fungi : An advanced treatise.*— In: *A taxonomic review with Keys Ascomycetes and Fungi imperfecti* / Ed. G. C. Ainsworth.— New York; London : Acad. press, 1973, vol. 4A, p. 323—621.
799. *The fungi : An advanced treatise.*— In: *A taxonomic review with Keys Basidiomycetes and lower fungi* / Ed. G. C. Ainsworth.— New York; London : Acad. press, 1973, vol. 4B, p. 851.
800. *Thornton R. H.* The screened immersion plate: a method of isolating soil microorganisms.— *J. Agr. Res.*, 1952, 5, N 2, p. 190—191.
801. *Tichy V. A., Schanel L.* Enzymy drevokaznych hub. II. Nectere oxydasove reakce hub z mykothekey laboratore fysiologie a anatomie rostlin.— Brno : Publ. Fac. Sci. Univ. I. E. Purhine, 1957.— 388 s.
802. *Tinline R. D.* Studies on the perfect stage of *Helminthosporium sativum*.— *Can. J. Bot.*, 1951, 29, N 5, p. 467—478.
803. *Tinline R. D., Stauffer J. F., Dickinson J. G.* *Cochliobolus sativus*. III. Effect of ultraviolet radiation.— *Can. J. Bot.*, 1960, 38, N 3, p. 275—282.
804. *Tomonaga G., Yanagita T.* A new method for the continuous production of protease by *Aspergillus niger*.— *J. Gen. and Appl. Microbiol.*, 1968, 14, N 3, p. 321—324.
805. *Townsley P. M., Lee E. G. H.* Response of fertilized eggs of the mollusc, *Bankia setacea*, to aflatoxin.— *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 1967, 50, N 3, p. 361—363.
806. *Tresner N. D., Hayes J. A.* Improved methodology for isolating soil microorganisms.— *Appl. Microbiol.*, 1970, 19, N 1, p. 186—187.
807. *Trinci A. P. J.* A kinetic study of the mode growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi.— *J. Gen. Microbiol.*, 1969, 57, N 1, p. 11—24.
808. *Trinci A. P. J.* Kinetics of apical and lateral branching in *Aspergillus nidulans* and *Geotrichum candidum*.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1970, 55, N 1, p. 17—28.
809. *Trinci A. P. J.* Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies.— *J. Gen. Microbiol.*, 1971a, 67, N 3, p. 325—344.
810. *Trinci A. P. J.* Exponential growth of the germ tubes of fungal spores.— *J. Gen. Microbiol.*, 1971b, 67, N 3, p. 345—348.
811. *Trinci A. P. J.* Growth of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa* in batch culture and an agar medium.— *Arch. Mikrobiol.*, 1973a, 91, N 1, p. 113—126.
812. *Trinci A. P. J.* The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*.— *Arch. Mikrobiol.*, 1973b, 91, N 1, p. 127—136.

813. *Trinci A. P. J., Collinge A.* Influence of L-sorbose on growth and morphology of *Neurospora crassa*.— *J. Gen. Microbiol.*, 1973, 78, N 2, p. 179—182.
814. *Trinci A. P. J., Righelato R. C.* Changes in constituents and ultra-structure of hyphal compartments during autolysis of glucose starved *Penicillium chrysogenum*.— *J. Gen. Microbiol.*, 1971, 60, N 3, p. 234—249.
815. *Trollope D. R.* The preservation of bacteria and fungi on anhydrous silica gel: an assessment of survival over four years.— *J. Appl. Bacteriol.*, 1975, 38, N 2, p. 115—120.
816. *Tubaki K.* Taxonomic study of Hyphomycetes.— *Ann. Rept. Inst. Fermentat.*, Osaka, 1963, 1, p. 25—54.
817. *Tubaki K.* Marine fungi from Japan.— *Appl. Microbiol.*, 1966, 7, N 1, p. 73—87.
818. *Tubaki K.* Studies on the Japanese marine fungi. Lignicolous group. III. — *Ann. Rept. Inst. Fermentat.*, Osaka, 1969, 4, p. 12—41.
819. *Tuite J.* Liquid nitrogen storage of fungi sealed in a polyester film.— *Mycologia*, 1968, 60, N 3, p. 591—594.
820. *Ueno V.* Inhibition of protein synthesis in animals cells by nivalenol and related metabolites.— In: *Toxic microorganisms : Proc. Conf. U. S.— Japan. Honolulu*, 1970, p. 76—79.
821. *Ueno V., Hosoya M.* Bioassay of toxic principles of rice infected with *Fusarium nivale* employing rabbit reticulocytes.— In: *Toxic microorganisms: Proc. conf. U. S.— Japan. Honolulu*, 1970, p. 80—81.
822. *Underkofler L. A., Severson G. M., Goering K. J., Christensen L. M.* Commercial production and use of moldbran.— *Cereal. Chem.*, 1947, 24, N 1, p. 1—22.
823. *Villanueva J. R.* Protoplasts of fungi.— In: *The fungi / Eds G. C. Ainsworth, A. S. Sussman*.— New York; London : Acad. press, 1966, vol. 11, p. 3—62.
824. *Waksman S. A.* Soil fungi and their activities.— *Soil Sci.*, 1916, 2, N 1, p. 103—105.
825. *Warcup J. H.* The soil-plate method for isolation of fungi from soil.— *Nature*, 1950, 166, N 4502, p. 117.
826. *Warcup J. H.* Effect of partial sterilization by formalin on damping-off of Sitka spruce.— *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1952, 35, N 2, p. 248—262.
827. *Warcup J. H., Baker H. F.* Occurrence of Dormant ascospores in soil.— *Nature*, 1963, 197, N 4874, p. 1317—1318.
828. *Wasowicz E.* Identification of the volatile flavor compounds in mushroom *Agaricus bisporus*.— *Bull. Acad. pol. sci. Ser. sci. biol.*, 1974, 22, N 3, p. 143—151.
829. *Watling R.* Chemical tests in agaricology.— In: *Methods in microbiology / Ed. C. Booth*.— London; New York : Acad. press, 1971, p. 568—597.
830. *Wensley R. N.* Microbiological studies of the action of some selected soil fumigants.— *Can. J. Bot.*, 1953, 31, N 1, p. 277—308.
831. *Whitney P. J., Vaughan J. B.* A disc electrophoretic study of the proteins *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy.— *J. Exp. Bot.*, 1968, 19, N 3, p. 415—426.
832. *William R., Amberson and Adelia Bauer.* — Electrophoretic studies of Muscle Protein. II. Complex formation between delta

protein, myogen and myosin.— J. Cell. Physiol., 1971, 77, N 3, p. 281—300.

- 833. *Williamson J. R., Corkey B. E.* Assay of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods.— In: *Methods in enzymology* / Eds J. W. Lowenstein.— New York; London : Acad. press, 1969, vol. 13, p. 434—513.
- 834. *Wood T. H., Mahajan S. K.* A rapid and efficient replica plating technique.— *Genet. Res.*, 1970, 15, N 3, p. 335—338.
- 835. *Zeldin M. H., Word J. M.* Acrylamide electrophoresis and Protein Pattern during Morphogenesis in a slime mould.— *Nature*, 1963, 198, N 4878, p. 389—390.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсолютная специфичность 165
Абсорбция 206, 220, 221, 223
Автолиз 141, 264
Авторадиография 285
Агаровый гель 242, 243
Агароза 174
Агранулоцитоз 305
Агрессивность паразита 358, 368, 431
Аденин 250, 349
Адениловые производные 250, 256
Аденозин 254, 255
Аденозинмонофосфат 223
Адсорбция 174, 279, 334
Азурэозин 88
Аконитаза 216, 217, 218, 223
Акридиновый желтый 93
— оранжевый 93, 95
Акриламид 481, 482
Активность альбуминазная 208
— глюкозооксидная 113
— молокосвертывающая 209
— фибринолитическая 209
Актидион (см. Циклогесимид) 396
Актинометр железооксалатный 379
Актиномицин D 284, 285
Аланин 108, 228, 229, 349, 452, 482
Аланинаминотрансфераза 161
Алеуроспоры 72, 73
Алиментарно-токсическая алейкия (АТА) 287
Алкалоиды 225, 316, 317, 318, 319, 320
Алкилирующие соединения 346
Аллели 351, 353, 354, 373, 374
— доминантные 357, 358
— рецессивные 357, 358
Аллерген 412
Альбидин 483
Альдолаза 161, 213, 221
Амебоид 25, 39
Амидочерный 481
Амилосахараза 198, 201, 202
Амана жидкость 391
Аминосахара 283
Амфолины 174
Анализ гибридологический 345, 351, 355, 359, 371, 372
— мутационный 345, 359
— органолептический 288, 289
— тетрадный 354
— элементарный 315
Анастомоз 138, 454
Анафаза 357
Анилин 84, 394, 474, 475
Анилингидрофтлат 192, 199
Анилиновый синий 92, 446, 477
Антагонисты 270, 271, 272
Антеридий 31, 33, 34, 36, 42
— амфигинный 36
— гипогинный 36
— диклинный 36
— моноклинный 36
— парагинный 36
Антиген 407, 408, 410, 411
— по Буавену 413
Антоциан 82, 176, 325
Антракноз 419
Антрон 202, 258
Апекс 73, 138, 152, 153
Апикальный рост 138
Апикулюс 54
Апотеций 40, 41
Аппарат рисовальный 78
Арабиноза 192
Аргинин 165, 229, 349

Арилсульфатаза 161
 Аритмия 300
 Арсенат 221
 Артроспоры 39, 72, 73, 352, 353, 354, 400
 Аска 40, 41, 352, 353
 Аскогон 42
 Аскоспора 40, 41, 42, 376, 399
 Аскострома 41
 Аспарагин 229
 Аспергиллоохрацеотоксикоз 287
 Аспергиллотоксикоз 287
 Аспергиллофумигатотоксикоз 287
 Ауксанограмма 400
 Ауксины 419
 Ауксотроф 162, 261, 347
 Аурамин 93, 96
 Ауорофосфин 93, 96
 Афлатоксикоз 287, 305
 Афлатоксин 117, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 310, 311, 312
 Ацетиламиносахара 258
 N-Ацетилгалактозамин 259
 N-Ацетилглюкозамин 254, 259
 Ацетил-КоА 216, 217, 218, 223, 224
 Ацетокармин 325
 Ацетонитрил 312

Бавендамма метод 176
 Базидиоспоры 43, 51, 54, 139, 352, 451, 452
 Базидия 42, 43, 45, 50, 51, 53, 54, 59
 Бальзам канадский 83
 Бацитрацин 282
 Беккросс 364
 Бекмана термометр 343
 Бензидин 177, 474
 Бензимидазол 347, 359, 362
 Бензол 335, 336, 338
 Берберин-сульфат 93, 96
 Березина метод 241
 Беркафельда свечи 110
 Бертрана метод 200
 Билай среда 114
 Биотест 322, 325, 326, 329
 Биотин 108, 261, 262, 264, 265, 349
 Биттинга и Биссерта метод 392
 Бифиалиды 73
 Бластомикозы 397
 Бластоспоры 71, 72, 73, 395
 Боверин 269
 Бодена — Готье среда 296
 Брайна среда 296

Бромтимоловый синий 207
 Бромфеноловый синий 242
 Бронхиолоэктазия 305
 Бронхоэктазия 305
 Брэди реактив 484
 Бэдкока среда 456

 Вагнера реактив 318
 Вакуоля 82, 325
 Ваксмана метод 433, 434
 Валин 228, 236, 349
 Ван-Сляйка метод 170, 234
 Ван-Тигема кольца 81
 Ван-Урка реактив 318, 320
 Варбурга аппарат 155
 Венкстерна — Баева таблицы 256
 Ветвление дихотомическое 35, 36, 61, 75
 — моноподиальное 35, 61
 — симподиальное 35, 61
 Вилт (см. Увядание) 418
 Вильштеттера метод 169
 Виоламин 446
 Виридикатин 483
 Виридикатопенициллотоксин 305
 Виридин 269, 278
 Вирулентность 350, 359, 370, 421, 427
 Висселинга метод 85
 Вишняк среда 488
 Водный синий 477
 Водоросли-макрофиты 445, 446
 Вольва 43
 Волютин 88, 89, 96
 Вуда лучи 391

Галактоза 192, 198
 Гамета 29, 31, 33, 38
 Гаметангий 29
 Гаметангиогамия 42
 Гаметогамия 29
 Гаметофит 29
 Ганка раствор 303
 Гаплоид 352, 356
 Гаплоидизация 356
 Гаустория 34, 92
 Гваякол 177, 474
 Гексозомонофосфаты 215
 Гексозомонофосфатный путь 214, 215, 261
 Гексокиназа 221
 Гексокиназная реакция 213
 Гель полиакриламидный 241

- Гельминтоспориоз 360, 363, 371
 Гельфибрин 209
 Гельфильтрация 172
 Гематоксилин 302, 446
 Гемма (см. Хламидоспора) 32, 139
 Гемоглобин 188, 211
 Гемолиз 305, 306
 Геморрагия 305
 Генотип 354, 356, 360, 362, 372
 Генциановый фиолетовый 84, 394, 477
 Геодин 277, 483
 Гетерогамия 29, 39
 Гетерокариозис 59, 138
 Гетерокарион 355, 359
 Гетеротроф 261
 Гибрид 351, 352
 Гибридизация 345, 352
 Гидрозинон 104
 Гидролазы 203
 Гидрохинон 308
 Гимений 41, 47, 49
 Гименофор 43, 45, 48, 49, 51, 52, 56, 439, 476
 Гимза раствор 87, 88
 Гиперплазия 305
 Гипертрофия 419
 Гипоксантин 349
 Гистидин 230, 349
 Гистоплазмоз 396
 Гифа 28, 29, 34, 35, 38, 39, 61, 67, 144, 145, 152, 153, 154
 Гифы аскогенные 41, 42, 84, 139, 140
 Гифы генеративные 48
 — гетерокариотические 355
 — скелетные 48
 — связывающие 48
 — ценоцитные 32
 Глеоцистиды 56
 Гликоген 75, 90, 91, 159, 306
 Гликозидаза 161
 Гликол 177
 Гликолиз 161, 213
 Глиоксилатный цикл 218
 Глиотоксин 269, 276, 277, 483
 Глицеральдегидтрифосфат 221
 Глицерофосфатдегидрогеназа 221, 222, 223
 Глицин 229, 236, 349
 Глутаматдегидрогеназа 161, 166
 Глюканаза 157
 β -Глюкозидаза 180, 182, 184, 186
 Глюкозооксидаза 165, 175, 176, 178, 179, 180, 187, 188
 Глюкозо-6-фосфат 215, 222
 Глюкозо-6-фосфатаза 161, 308
 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 215, 221, 222
 β -Гликопиранозидаза 198
 Глутамин 228, 229
 Гологамия 29, 32, 38
 Голоциты 39
 Гомогенизатор 199
 Гомосерин 229
 Городковой среда 399, 485
 Горяева камера 262, 296, 346, 362, 370, 379, 440, 441
 Гризеофульвин 269, 275, 279, 483
 Гуаниловые производные 256
 Гуанин 251, 349
 Гуанозин 254
 Гуанозинтрифосфат 223
 Густафсона и Фриза среда 488
 Гутштейна метод 84
 Гюйгенса объектив 80
 Дегенерация гиалиновая 305
 Дезоксицитидинтрифосфат 285
 Декарбоксилирование окислительное 217, 223
 Декстран 201, 202
 Декстрансахараза 198, 201, 202
 Делафильда гематоксилин 86
 Денатурация 171, 172
 Дендродохин 299, 300, 305, 309
 Дендродохиотоксикоз 287
 Денситометрия 260
 Депротенинизация 317
 Дерматомироз висцеральный 405
 Дерматонекротическое действие 293, 305, 306
 Дерматофиты 390, 399, 403
 Дерматоцистиды 45
 Диализ 101, 172
 о-Дианизидин 177, 294
 Дивинилбензол 251
 Дикарион 42, 352
 Диметиламинобензальдегид 258, 259, 318
 Диморфизм 32, 141
 2,4-Динитрофенилгидразин 258, 484
 Дионилфталат 341
 Диоксиацетонфосфат 213, 221, 222
 Дипланенизм 32
 Диплоид 352, 353
 Диплоиды гетерозиготные 355
 Дипропионитриловый эфир 341
 Дитип неродительский 354

— родительский 354
o-Дифенолоксидаза (см. Тирозиназа)
Дифко экстракт 487
Дмитриевой таблицы 275
ДНК-полимераза 284
Дозиметрия 379, 384
Дозные кривые 380, 386, 389
Драгендорфа реактивы 318, 319, 320
Дэвиса метод 91
Дюбуа раствор 410
Дюма метод 343

Жаккара формула 440
Жгутик 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34
Желатин 207
Желатиназные свойства 207
Железопротеиды 175
Желчь медицинская 347, 362
Жидкость по Буину 391

Заражение внутривенное 404
— интрагландулярное 403
— интракардиальное 404
— интраперитонеальное 404
— интраплевральное 404
— интратестикулярное 403
Заражение интрацеребральное 405
— субкутанное 404
— эпидермальное 403
Зеараленон 306, 312, 313, 314
Зейтца фильтр 110, 367, 368, 401
Зигогамия 38, 39
Зигоспора 29, 39
Зигота 39, 41
Зимограмма 400
Зонненшейна реактив 318
Зооспора 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36
Зооспорангий 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36
Зухфризин 93

Изатин 230
Излучение ионизирующее 376, 383, 388
Изогамета 30
Изогамия 29
Изогенные линии 359, 364
Изолейцин 229, 349
Изоцитратдегидрогеназа 216, 217, 223

Изоцитратлиаза 218, 224
Изоэлектрофокусирование 174, 175
Иммунодефицитность 390
Иммунотерапия 406, 415
Инвертаза (см. Сахараза) 197, 198, 199, 200
Инозит 108, 262, 349
Инокулюм 141, 142, 377, 381, 449, 460
Инулаза 202
Инулин 198
Исландиотоксин 305

Йодацетальдегид 162
Йодацетат 161
Йоргенсена — Вайбли метод 176

Казеин 211
— по Гаммарстену 211
Калия йодплатинат 320
Камфора 355
Канесцин 483
Каолин 174
Карбазол 257, 258
Карборафин 252
Кармин 87, 325
Карнуа жидкость 83, 84, 85, 87, 89, 92, 96, 325
Карпофоры 43, 47, 52, 59
Карцинома 305, 306
Каталаза 161, 175, 176, 178
Катепсин 161
Келлера метод 77
Кербера метод 304
 α -Кетоглутарат 217
 α -Кетоглутаратдегидрогеназа 216, 217, 223
Кислота γ -аминомасляная 228, 229
— аспарагиновая 228, 230, 349
— аспергилловая 269, 483
— N-ацетилмурамовая 283
— галактуроновая 192
— гельволевая 483
— гладиоловая 277, 483
— аконитовая 217
— аминотерефталевая 93
Кислота глиоксиловая 218, 224
— глутаминовая 228, 229, 349
— гуанозинпропионовая 250
— дезоксихолевая 347, 362
— изолимонная 217, 218, 223, 224
— изомасляная 255
— итаконовая 161

- койевая 483
- кремневольфрамовая 318
- лимонная 217, 223
- липовая 217, 261
- микофеноловая 269, 276, 483
- молочная 166
- муравьиная 252
- никотиновая 261, 262, 265, 327, 349
- осмиевая 294
- пантотеновая 261, 262, 264, 265, 349
- парааминобензойная 349
- пектиновая 191
- пектовая 195
- пеницилловая 276, 313, 484
- перхлорная 307
- пировиноградная 213, 223
- полигалактуронозная 191
- пуберуловая 269, 276, 484
- пуберулонозная 276, 484
- салициловая 250
- стипитатозная 269
- терреевая 277, 484
- устилаговая 269
- Кислота фолиевая 261, 349
- фузариевая 277, 329, 330, 331
- фуксинсернистая 294
- фумаровая 217, 223
- циклопалдиевая 485
- щавелевоуксусная 217, 223, 224
- яблочная 217, 218, 224
- янтарная 217, 218, 223, 224, 316
- Кисточки бивертицилляторные 65
- двумуточчатые 65
- моновертицилляторные 65
- одномуточчатые 65
- Клавицепстоксикоз 287
- Клейстотетий 40, 399
- Клетки асцитные 281, 307
- конидиогенные 61
- Клоны 359, 360, 362, 363, 364
- Клофильда фиксатор 102
- Клюшника метод 451
- Кнейси метод 84
- Кобаламин 261
- Кобеля метод 92
- Кнопка раствор 328
- Кольмьера метод 447
- Кокцидиоз 396
- Комптоновский эффект 383
- Конго красный 84
- Конидиеносец 42, 60, 61, 64, 65, 66, 67, 69
- Конидия 34, 35, 36, 38, 42, 55, 59, 60, 61, 68, 69, 70, 71, 72, 80, 91, 139, 146, 289, 428, 444
- Коникова метод 413
- Конъюгация 357
- Коремии 60, 61, 67, 428
- Корифосфин 93, 94, 95, 96
- Коха среда 489
- Крахмал 184, 196, 248
- Креатинкиназа 284
- Крезил синий 474, 475
- Кроссинговер 354, 356, 357
- Ксиланаза 189
- Ксилоза 192
- Курунга среда 485
- Кутикула 45, 52, 421
- Куцева метод 261
- Лакказа 177, 474
- Лактатдегидрогеназа 161, 166, 222, 223
- Лактофенол 391, 394, 475
- Лассеня проба 343
- Лафта метод 102
- Леван 198, 202
- Левансахараза 202
- Лейкопения 305, 306
- Лейцин 228, 229, 307, 349
- Леффлера синь 84, 89
- Ли метод 381
- Либермана — Бурхарда реакция 308, 483
- Лигнин 85
- Лизин 165, 230, 349
- Лизосома 308
- Ликомаразмин 269
- Лилацин 269
- Лимфопения 305
- Лиофилизация 219, 220, 336, 468
- Липаза 157, 169
- Локула 41
- Локус 351, 373
- Лоури метод 241, 249
- Лучи рентгеновские 346
- ультрафиолетовые 346, 376
- Люголя раствор 84, 89, 90, 91, 394, 395, 401
- Ля-Туш ловушка 436
- Магдала красный 94
- Магнийфлюорофосфат 161
- Маделина среда 489
- Мак-Ильвейна раствор 101

- Макрогаметангий** 29
Макроколония 380, 385, 386, 389
Макроконидия 69, 70, 71, 140, 428
Малатдегидрогеназа 216, 217, 218, 223, 224
Малат-синтаза 218, 224
Маннит 316
Масс-спектрометрия 226
Маттисон, Фалиной, Пасскель среда 489
Мацерация 191, 192, 394
Мединал 102
Медь-протеиды 175
Медиостратум 50
Мезенхима 303
Мейера метод 88, 89
Мейера реактив 318
Мейоз 345, 351
Меланин 91
Мельцера реактив 475
Меристема 322, 325
Мерк 252
Меркаптид-КоА 224
Меркаптоэтанол 285
Меркаптоэтаноламин 284
Мерогамия 29
Мероспорангий 38
Мертиолат 406
Метаболиты вторичные 138, 141, 147, 261, 269
— первичные 138, 147
Метаболический коэффициент 156
Метакрилат 104
Метахроматин 82, 88
Метиленовый синий 83, 144, 477
Метиловый красный 82
— оранжевый 248
— фиолетовый 84
Метионин 228, 236, 349
Метод агаровых пленок 440
— водных смывов 437
— диффузии в агар 274, 280, 285, 286
— желобка 273
— лунок 275
— микрокультуры 82, 146
— накопления 290
— отпечатков 348
— почвенных срезов 440
— приманок 436, 442
Метод реплик 103
— серийных разведений 274, 285, 299
— цилиндров 275
Метод штриха 272
- Метули** 65, 66
Микозы 390
Микрогаметангий 29
Микроконидии 69, 71, 139
Микрометр объективный 78, 79, 80
— окулярный 78, 79, 80
Микросклероции 74, 75
Микроскопия люминесцентная 92, 97
— фазово-контрастная 77
— электронная 97
Микросомы 308
Микроцид 269
Митоз 357
Митомицин 284
Михаэлиса константа 168
Михаэлиса — Ментен уравнение 168
Мицелианамид 269, 483
Мицелий воздушный 36, 144
— субстратный 144
— ценоцитический 34, 36
— эндофитный 34, 36
Мицеллы 180
Молиша реакция 413
Моногенные линии 359
Мононуклеотиды 251
Морин 93
Морфогенез 146, 243, 325, 430
Мумификация 419
Мутаген 346, 367
Мутагенный фактор 345, 346, 350, 377, 383
Мутагенный эффект 350
Мутант 162, 345, 349, 350, 351
Мутации спонтанные 346, 359, 367
Мутирование спонтанное 367
- Наумова метод** 91
β-Нафтол 176, 177, 475
Небуларин 269
Нейссера метод 88
Нейтральный красный 93, 94
Некроз 323, 365, 418
Некрозы фокальные коагулятивные 305
— центролобулярные 305
Несслера реактив 340
Никифорова смесь 410
Нильский голубой 89, 90
Нингидрин 231, 234, 235
Новобиоцин 284
Ножка 36, 43, 52, 56, 58, 66, 69, 71, 439, 449

- Норит 252
 Нотатин 484
 Нуклеаза 172, 202, 203, 204, 206
 Нуклеозидмонофосфаты 203, 251, 257
 Нуклеотидкоферменты 251, 259
- Обратимость фотоэффекта 378
 Огата среда 204
 Оидии 54, 273, 274
 Окраска по Виртцу 399
 — Граму 393, 394
 — Имшенецкому 90
 — Кондо-Шоу 399
 — Куферату 399
 — Романовскому — Гимза 395
 — Флеммингу 86
 — Цилю — Нильсену 394
 Олеандомицин 283
 Олеиферы 47
 Олигогалактурониды 192
 Олигонуклеотидгидролазы 203
 Онихомикоз 403
 Оогамия 29, 31, 33, 34, 36
 Оогоний 28, 33, 34, 36
 Ооплазма 34
 Ооспора 29, 33, 34, 36
 Ооспора аплеротическая 36
 — плеротическая 36
 Орнитин 229, 349
 Орцин 257
 Оствальда вискозиметр 196, 209
 Охратоксин 305, 312, 313, 314
- Паладе фиксатор 101, 102
 Папилла 26
 Паразит факультативный 359, 361
 Паразитизм 31, 359
 Параморфный эффект 347
 Паранитроанилин 294
 Параплектенхима 74
 Парасексуальный процесс 138, 359
 Парафиза 40, 41
 Парафторфенилаланин 356
 Паренхима 302, 305, 306, 326
 Патоген 359, 365, 431
 Патулин 269, 276, 277, 293, 298, 312, 484
 Пектин 191, 192, 193, 194, 196
 — свекловичный 193, 194, 347, 362
 Пектиназа 191, 192
 Пектинэстераза 191, 192
 Пектолиз 196
- Пенициллин 269, 275, 277, 282, 283, 286, 302
 Пенициллиназа 286
 Пеницилловеридикатотоксикоз 287
 Пенициллоисландиотоксикоз 287
 Пенициллорубратоксикоз 287
 Пенициллотоксикоз 287
 Пенициллоуртицетоксикоз 287
 Пенициллоцитреовиридетоксикоз 287
 Перетяжка 31, 34
 Перидий 41, 66
 Периплазма 34, 36
 Перитеций 40, 41, 352, 444
 Перкина метод
 Перколяторы 337
 Пероксидаза 175, 176, 177, 201
 Петри чашка 81, 97, 111, 116, 119, 120, 121, 142, 153, 208, 262, 290
 Пешкова метод 84
 Пигменты 85, 174, 225, 233, 325, 347, 399, 474, 475, 476
 Пигменты каротиноидные 377, 378
 — меланиновые 378
 — флавиновые 377
 Пидопличко метод 81
 Пикнида 60, 65, 66, 67, 422, 429, 444
 Пикрофуксин 91
 Пионноты 65, 67
 Пирамидон 475
 Пиридин 234, 335
 Пиридоксин 107, 261, 262, 264, 265, 327, 349
 Пирогаллол 475
 Пироксиплексин 308
 Пируват 161, 213, 216, 218
 Пируватдегидрогеназа 216, 217
 Пируваткиназная реакция 213, 222, 223
 Пневматофоры 447
 Планкета среда 489
 Планозигота 29
 Плевроцистиды 56
 Плектенхима 74
 Плято — Нейссера метод 412
 Пневматоз 305
 Пневматофоры 445
 Полигалактуроназа 191, 193
 Полифиалиды 73
 Пороспоры 72, 73
 Пострадиационное восстановление 388, 389
 Прегля метод 343

Предтеченского камера 296
Примордий 43
Примулин 93, 95
Гримулиновый желтый 94
Проба алиментарная 292
— глазная 294
— внутрикожная 416
— кожная 292
— резорциновая 308
Прозоплектенхима 74
Пролин 229, 230, 349, 452
Пролиферация 306
Проспорангий 29
Протамин 172
Протеаза 157, 172, 264
Протосубтиллин 174
Прототроф 347
Пряжки 47, 48, 56
Псевдосепта 34
Пуриновые производные 251
Пустула 361, 362, 367, 368, 370, 373, 375, 419
Пфейфера фуксин 84
Пфистерера метод 104

Радиолиз 380
Радиорезистентность 385
Радиочувствительность 385
Радуласпоры 72, 73
Рамсдена окуляр 80
Ранвье камера 81
Раскиной метод 89
Раствор-дифференциатор 481, 482
— фиксатор 481, 482
Раффиноза 198, 201
Реакция гемагглютинации 407
— иммунолюминесценции 410
— кольцепреципитации 408
— связывания комплемента 409
Рекефертин 318
Рекомбинант 356
Рекомбинация 356
Репарация темновая 382, 383
Ретикулоциты 307
Рибонуклеат-3'-олигонуклеотидо-гидролаза 203
Рибонуклеотиды 250
Рибофлавин 108, 246, 261, 267, 268, 349, 481, 482
Ридер среда 262, 263, 264, 265
Ризоиды 26, 27, 30, 32, 34
Ризомицелий 28
Ризоморфы 58, 74, 454 (см. также Тяжи мицелиальные)
Ризофоры 445

Рингера — Локка раствор 300
РНК-полимераза 284, 308
РНКазы гуанинспецифичные 203
— неспецифичные (см. Рибонуклеаза II) 203
— пиримидинспецифичные 203
— циклизующие 203
Родамин 93
Розовый красный 93
Ролена — Тома среда 487
Росси — Холодного метод 426
Ругулозин 484
Рыжкова метод 280
Рэонин А 93

Сабуро агар 396, 488
Сабуро среда 405, 412, 485
Сапрофит 31, 156, 445
Саркома 305
Сахараза 197
Сахарозо-6-глюкозилтрансфераза 201
Сахарозофосфорилаза 198, 201
Сахарозо-1-фруктозилтрансфераза 202
Сведберга единица 158
Сегреганты 355, 356, 357
Седиментация 158
Седогептулозо-7-фосфат 215, 222
Селектирующий агент 350
Сергиева метод 407
Серенсена метод 190
Серенсена формула 440
Серин 228, 229, 236, 349
Сефадекс 285, 312
Синдром эстрогенный 306
Синергидное действие 321
Синнематин (см. Цефалоспорин) 275
Системы гифальные
— димигические 48
— мономитические 48
Системы гифальные тримитические 48
Склероции 58, 74, 75, 139, 141
Смирнова среда 327
Сокслета аппарат 85, 293, 310, 314
Сорбент 340
Сорт-дифференциатор 359, 365, 366, 427
Спектральный анализ 343, 344
Спермаций 352, 353
Спермогонии 352, 353
Спинулозин 269, 484
Спирт гентизиловый 483

- Спора 26, 29, 36, 55, 139
 Спорангий 29, 32, 37, 38, 39
 Спорангиола 37, 38, 39
 Спорангионосец 37
 Спорангиоспора 37, 38, 39, 139, 429
 Споридесмин 305
 Спородесмиотоксикоз 287
 Спородохия 61, 65, 291, 429
 Спороложе 60, 61, 67
 Спороносец 35
 Споротрихиеллофузариотоксин 306
 Спорофит 29
 Спорофоры 43
 Спорофузарин 308
 Споры покоящиеся (см. Цисты) 30, 55
 — экзогенные (см. Конидии) 31, 39
 Стахиботриотоксикоз 287, 306
 Стахиботритоксин 305, 309
 Стереохимическая специфичность 166
 Стеригма 36, 53, 54, 73
 Стеригматоцистин 312, 313
 Стилоспорангий 37
 Стилоспоры 37
 Столоффа метод 312
 Стоутона метод 91
 Стрептомицин 283, 302, 488
 Стэкмена — Левина шкала 365
 Сугимори среда 489
 Судан 84, 89, 294
 Сукцинатдегидрогеназа 161, 216, 217, 223
 Сукцинат-тиокиназа 223
 Сукциниладенозин 254, 255
 Сульфованилин 476
 Сульфоформалин 476
 Сумки битуникатные 41
 — прототуникатные 41
 — унитуникатные 41
 — эутуникатные 41
 Сумкоспоры 139
 Сферопласты 283
 Сфероцисты 45, 47, 50

 Таллом 446
 — гаплоидный 33
 — голокарпический 29, 30, 32
 — интербиотический 27
 — интерматрикальный 27
 — интраматрикальный 26, 27, 30
 — моноцентрический 28, 30
 — полицентрический 27, 28, 30
 — эукарпический 29, 30, 32
 — экстраматрикальный 26, 30
 — эндобиотический 26, 30, 32
 — эпибиотический 26, 30, 32
 Танин 84, 176, 177
 Тардин 484
 Тахикардия 300
 Телейтоспоры 43
 Телиоспоры 352
 Террецин 484
 Тест-клон 372, 374
 Тетраборат 258
 Тетратип 354
 Тиазоловый желтый 93
 Тиамин 108, 261, 262, 264, 265, 327, 349
 Тимидин 307
 Тимин 349
 Тимолфталейн 211
 Тионин 477
 Тиосульфат 349
 Тиофлавин 93
 Тирозин 165, 170, 177, 211, 212, 229, 230, 235, 349
 Тирозиназа 177
 Тома камера 296, 379
 Топачио метод 397
 Трама гименофоральная 49, 50, 51, 56
 Трансальдолаза 215, 222
 Транскетолаза 215, 222
 Траппе ряд 334, 335, 336
 Трауберга реактив 485
 Треонин 229
 Триозофосфатдегидрогеназа 221
 Триозофосфатизомераза 213, 221, 222, 223
 Трипофлавин 93, 94
 Триптофан 170, 211, 229, 230, 237, 349, 452
 Тритон 362
 Трихогина 42
 Трихоспора 39
 Трихотецин 269, 277
 Трихофития 392
 Тромбопения 305
 Тульчинского реактив 200
 Тяжи мицелиальные 58, 74
 Тунберга пробирки 307

 Увядание 418
 Удельная скорость роста 148, 149, 150, 151, 152
 Ультрамикротом 104

- Ультрафильтрация 174
 Ультрацентрифуга 158
 Упаривание 252, 336, 337
 Уранилацетат 205
 Уратоксидаза 161
 Урацил 251, 307
 Уреаза 165
 Уредоспоры 352, 421
 Уридиловые производные 250, 256
 Уридин 254, 303
 Уридиннуклеотиды 283
 Уридин-5-пирофосфат 283
 Устойчивость горизонтальная 358, 359, 428
 — неспецифическая 358, 359, 369, 370
 Уфидозиметр 379
- Фавус 392
 Фагостатическое действие 281
 Фелинга реактив 483
 Фенилаланин 165, 228, 229, 349, 356
 Фенилгидразин 224, 307
 Фенилгидразон 224
 Феницин 484
 Фенол 228, 338, 476
 Феноланилин 476
 Фенолоксидаза 176
 Фенолфталеин 210, 249
 Ферментопатия 390
 Ферменты амилаолитические 172
 — гликолитические 213
 — казеинолитические 208
 — лизосомальные 308
 — пектолитические 136, 191, 192
 — протеолитические 207
 — фибринолитические 209
 — целлюлозолитические 181
 Фецин 308
 Фельгена метод 85, 96
 Фиалида 61, 63, 64, 65, 66, 67, 73
 Фиалоспора 73
 Фибрин 209
 Фибриноген 209
 Фиброз 306
 Фиске и Суббароу метод 169
 Фитотоксин 277, 321, 322, 325, 326, 327, 328, 329, 339
 Фитотоксическое действие 277, 321, 322, 324
 Флавопротеид 223
 Флемминга жидкость 83, 92
 Флора гипотеза 359
 Флороглюцин 85
- Флотация 157
 Флюоресцеин 93
 Флюорид 161
 Флюорохромы 92, 94, 95, 410
 Фолина реактив 249
 Формазан 160
 Формалин 476
 Формольное титрование 210
 Фосфин ЗР 93, 94
 Фосфогидролазы 203
 1,3-Фосфоглицерат 222
 Фосфоглицерат 161
 Фосфоглицераткиназа 222
 Фосфоглицератмутаза 222
 3-Фосфоглицериновый альдегид 213, 215, 216, 221, 222
 Фосфоглюкоизомераза 221
 6-Фосфоглюконат 215, 222
 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа 215, 222
 Фосфокреатин 284
 Фосфорилирование окислительное 217
 — на уровне субстрата 213
 Фосфофруктокиназа 213, 221
 Фосфоэнолпируват 213, 222, 223
 Фотолюминесценция 92
 Фотореактивация 382
 Фоторецептор 376, 377, 378
 Фототропизм 376
 Фоточувствительность 378
 Фрагмобазидии 42, 53
 Фрейда адъювант 416
 Фреквентин 277, 484
 Фриза метод 451
 Фруктоза 197, 198, 201, 202
 β -Фруктозилтрансфераза 198
 Фруктозо-1,6-дифосфат 221
 Фруктозо-6-фосфат 213, 215, 221, 222, 223
 Фруктокиназная реакция 213
 β -Фруктофуранозидаза 201
 β -Фруктофуранозил 198
 Фукса — Розенталя камера 328
 Фузариограмминеаротоксикоз 287
 Фузарионивалетоксикоз 287
 Фузариоз 431
 Фузариотоксин 298
 Фуксин 84, 95
 Фуксин карболовый 84, 90, 394
 — по Цилю 89
 Фумагиллин 269, 281
 Фумараза 217
 Фумигатин 484
 Фумигатотоксин 298

Фумараза 216
Фунгин 250
Фунгистатические свойства 273
Фунгицид 350
Фурациллин 396
Фюрта и Дише метод 236

Хабгуда метод 366
Хагедорна — Йенсена метод 85
Хасты среда 355
Хейлоцистиды 56
Хеллера среда 327
Хемостат 131
Химотрипсин 165
Хитин 30, 85, 250
Хитозан 85
Хламидоспора 43, 55, 61, 73, 74,
75, 139, 140, 145, 273, 274,
399, 400, 428, 454
Хлопчатобумажный синий 446, 477
Хлоралгидрат 391
Хлорамин 326, 327
Хлороз 365, 373
Хлоромитетин 283, 284
Хлорофилл 94, 324
Хлороформ
Хогланда среда 324
Холестерин 306
Холин 349
Холинэстераза 161
Холлидея метод 349
Холобазидии 42, 53
Холодного стекла 436
Хорна метод 237
Хоттингера агар 113, 116
Хроматиды 354, 357
Хроматин 89
Хроматография адсорбционная 225
— аффинная 174
Хроматография восходящая 192,
276, 331
— газовая 341
— газо-адсорбционная 341
— газо-жидкостная 341
— двумерная 228
— ионообменная 225, 226, 251
— жидкостная 174
— круговая 192
— микротонкослойная 259
— на колонке 311, 339
— одномерная 228
— осадочная 225
— противоточная 285
— распределительная 228

— сборная 276, 309
— тонкослойная 227, 251, 259, 309,
311, 317, 318, 319, 332, 340
Хромосома 87, 351, 353, 354, 356
Хромофор 344

Целлобиоза 180, 181, 182, 186
Целлодекстрины 182
Целлюлаза 157, 180
Целлюлин 34
Целлюлоза 30, 85, 174, 180, 181, 184,
259
Центрифугирование дифференци-
альное 157, 159
— зональное 157
— изоплотностное
Центромера 354, 357
Цефалоспорины 269, 275, 277, 282,
484
Цианид 162, 223, 343
Цианоз 306
Циклогексан 335
Циклогексимид 487
Циклосерин 282
Циммермана раствор 483
Цистеин 221, 222, 229, 349
Цистидиолы 56
Цистиды 50, 51, 56, 57, 59
— гимениальные 56
— траматические 56
Цистин 229
Цисты 29
Цитидиловые нуклеотиды 250, 256
Цитидин 254
Цитозин 251
Цитохромоксидаза 161, 162
Цитохромы 170, 175
Цитрат-синтаза 216, 217, 218, 223,
224
Цитреовиридин 306
Цитринин 276, 313, 485
Цитромицетин 485
Цитрулин 229

Чапека среда 107, 113, 122, 182, 189,
204, 263, 265, 270, 296, 321, 487
Чапека — Докса среда 136, 296
Чередование изоморфное 29
— гетероморфное 29
Честерса трубка 436

Шабадаша метод 91
Шайблера реактив 318

Шамберлана свечи 110, 412
Шаудина фиксатор 83
Швейцера реактив 85
Шеффера реактив 475, 576
Шиффа основание 230
— реактив 86, 91, 483, 484
Шлигина — Роулинга — Егорова
метод 280
Шляпка 43, 45, 52, 56
Шомодьи — Нельсона метод 185,
186, 200
Шорина метод 280
Шуттель-аппарат 146

Эгера метод 457
Экзоглюканаза 180, 181
Эксонуклеазы 203
Экзополигалактуроназа 191, 195,
196
Экзоспорий 36, 54
Экономический коэффициент 155
Эксикатор 337
Экспоненциальная фаза 141, 142,
153
Экстракт бычий 204
— дрожжевой 204
— кровохлебки 93, 94
— ревеня 94
— чистотела 93, 94
Электрофореграмма 242, 243, 247,
344
Эллмана реактив 223, 224
Элсона — Моргана реакция 283

Элюотропный ряд (см. Траппе ряд)
334, 335
Элюция 252, 253, 279
Эндоглюканаза 180, 182, 186
Эндоконидии 71
Эндонуклеазы 203
Эндополигалактуроназа 191, 192,
196
Эндоспорий 36, 54
Эндоспоры 39
Энолаза 161, 222
Эозин 86, 87
Эпидермис 36
Эпиплазма 42
Эписпорий 54
Эпистаз 354
Эпокситрихотецен 313
Эрготалкалоиды 320
Эрготоксины 306
Эритразма 392
Эритрозин 86, 87
Эритрозо-4-фосфат 215, 222, 223
Эритромицин 283
Эрквеин 485
Эрленмейера колба 117, 118, 122,
124, 125, 209
Эрлиха гематоксилин 89
Эстуарии 441
Эцидиоспоры 352, 421
Эцидия 352, 353

Яйцеклетка 31, 33, 34, 36
Янус зеленый 88, 160

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ

- Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. et Trott. 121
 — *ramosa* (Lind.) Lendn. 121
Acervulales 60, 61
Acorus calamus L. 27
Acrocylindrium sp. 206
Agaricales 49
Agaricus 452, 475
 — *bitorguis* (Quel.) Sacc. 457, 458
 — *campestris* Fr. ex L. 451, 453
 — *kuehnerianus* 56
 — *rubellus* Gill. 458
 — *silvaticus* Secr. 450, 454, 457
 — *xanthodermus* Genev. 59
Albuginaceae 36
Alternaria Nees ex Fr. 69, 73, 287, 296, 384, 419
Amanita Pers. 43, 450, 451, 453
Amoebidiales 39
Aphyllophorales 48
Armillaria mellea (Vahl.) Fr. 450
Armillaria mellea (Vahl.) Er. 450, 453, 458, 459
Ascochyta melonis Potebn. 359, 419, 471
Ascomycetes 25, 40, 441
Ascomycotina 59
Ascophyllum 445
Asellariales 39
Aspergillus Micheli ex Fr. 39, 64, 69, 73, 107, 115, 116, 141, 275, 289, 292, 295, 296, 304, 385, 432, 439, 466
Aspergillus awamori Nakazawa 107, 116
 — *batatae* Saito 137
Aspergillus flavus Link 117, 287, 294, 297
 — *foetidus* (Nakazawa) Thom et Raper 134, 136
 — *fumigatus* Vuill. 281, 287, 297
 — *nidulans* (Eidam) Wint 153, 154
 — *niger* Van Tieghem 107, 115, 121, 134, 136, 137, 471
 — *ochraceus* Wilhelm 64, 287
 — *oryzae* (Ahlb.) Cohn 107, 111, 118, 121, 206
 — *pallidus* Kamyschko 225
 — *quercinus* (Bain.) Thom et Church 206
 — *terreus* Thom 115, 161
 — *terricola* Marchal 264
 — *usamii* Sakaguchi, Iizuka et Yamazaki 137
Auricularia auricula (Fr.) Schroet. 458
Avicennia 446, 447
Azotobacter Beijerinck 298

Bacillus megatherium De Bary 298
 — *mesentericus* Trev. 329
 — *subtilis* (Fhrenberg) Cohn 297, 298, 329, 330, 331
Ballia 445
Bankia setaceae 299
Basidiomycetes 25, 42, 43, 441, 474
Basidiomycotina 59
Basidiophora Rose et Cornu 36
Beauveria Vuill. 72, 73
Beta vulgaris L. 325
Bispora Corda 73
Blastocladales 29
Blastomycetes 61
Boletus Fr. 451, 456
Boletus edulis Fr. 453

- Botrytis allii* Munn 469
Botrytis cinerea Pers. 75, 378, 420, 427
Brachydanio`rerio 299
Bremia Regal 35, 36
- Calocibe gambosa* (Fr.) Donk 450
Calvatia caelata Morg. 455
 — *excipuliformis* (Pers.) Perd. 454, 455
 — *gigantea* Fr. 451
Candida albicans (Robin) Berkh 399
 — *stellatoides* (Jones et Martin) Langeron et Querra 62, 298
Cantharellus cibarius Fr. 450
Catenularia Grove 73
Cephalosporium Corda 276
Chaetocladium Fres. 38
Chaetomium Kunze ex Fr. 436, 469
Chlorella vulgaris Beyer. 324
Chytridiales 25, 26, 28, 29, 32
Chytridiomycetes 25, 441
Chytridium olla A. Br. 28
 — *papillatum* 28
 — *versatile* 28
Cladochytriaceae 28, 29
Cladochytrium tenuae Nowak 27
Cladotrium tenuae 28
Cladosporium Link ex Fr. 72, 73, 419, 469
 — *cladosporioides* (Fres.) de Vries 388
 — *fulvum* Cke. 359
Claviceps Tul. 250, 419
 — *paspali* Stev. et Hall 287
 — *purpurea* (Fr.) Tul. 287
Clitocybe nebularis (Fr.) Quel. 450, 453, 455, 459
 — *vibescina* 450, 453
Coelomycetes B. et C. 61
Cochliobolus Drechsler 352
Colletotrichum lagenarium (Pass.) Ell. et Halst. 359, 419
 — *lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav. 487
Collybia (Fr.) Kummer 453
Comphidius 450
Coniophora DC. ex Merat 456
Coprinus Gray 54, 453, 456
 — *comatus* (Fr.) S. F. Gray 450
 — *ephemerus* (Bull.) Fr. 455
 — *lagopus* Fr. 458
 — *radiatus* (Bolt.) Fr. 459
Coremiales 60, 67
- Coriolellus* Murr. 456
Coriolopsis 456
Cortinarius Fr. 450, 451
Cortinarius delibutus Fr. 454
Cosmarium Corda 26
Cunninghamellaceae 38
Curvularia Boedijn 73
Cyathus stereoreus (Schw.) De Toni 456
Cyclotella 26
Cylindrocarpon Wollenw. 68
Cystoseira 445
Cytospora Ehrenb. ex Fr. 420
- Debariomyces bisporus* 262
Dematiaceae 73, 376, 386, 387
Dendrodochium caucasicum Pidopl. et Bilai 287, 291, 296
 — *toxicum* Pidopl. et Bilai 111, 112, 143, 287, 291, 295, 304
Dendryphion nanum (Nees ex Fr.) Hughes 68
Deuteromycetes 25, 42, 59, 60, 61, 441
Deuteromycotina 59
Dimargaritaceae 38
Draparnaldia Bory 27
Drechslera teres (Sacc.) Shoemaker 359, 361, 362, 363, 365, 487
- Eccrinales* 39
Ectrogellaceae 30, 32, 33
Ectrogella monostoma 32
Elodea canadensis Rich. 325
Endogasteromycetidae 42
Endogonales 39
Entomophthorales 36, 38, 390
Epilithon 445
Erisiphe cicchoroceanum D. C. 359, 419, 427
 — *communis* Grev. 40
 — *graminis* D. C. 359, 426
Escherichia coli Cast. et Chalm 265, 266
Eumycota 59
Exoascus Fuck 419
Exobasidiales 43
Exogasteromycetidae 42
- Fabospora fragilis* 262
Fistulina hepatica Fr. 455
Fomitopsis annosa (Fr.) Karst. 453

Flammulina Karst. 452, 453
Frammulina velutipes (Fr.) Sing. 454, 456, 457, 458
Fragmobasidiomycetidae 42
Fucus Tourn. 445
Fungi imperfecti 25, 470
Fusarium Link ex Fr. 69, 70, 102, 107, 141, 250, 289, 292, 294, 295, 296, 385, 419, 420, 430
— *avenaceum* (Fr.) Sacc. 142
— *culmorum* (W. G. Sm) Sacc.
— *graminearum* Schwabe 287, 292
— *javanicum* Koord 95
— *moniliforme* Sheld. 88, 103, 139, 329, 330
— *moniliforme* Sheld var. *lactis* (Pir. et Rib.) Bilai 140
— var. *subglutinans* Wr. et Rg. 140
— *nivale* (Fr.) Ces. 287
— *oxysporum* (Schlecht) Snyder et Hals. 140, 142, 143, 329, 330, 427
— *poae* (Pk.) Wr. 297
— *solani* (Mart.) App. et Wr. 87, 140, 142
— *sporotrichiella* Bilai 287, 291
— *sporotrichiella* Bilai var. *tricinctum* (Corda) Bilai 313
— *trichothecioides* Wr. 87, 142
— *tricinctum* (Corda) Snyder et Hansen 313
Fusicladium dendriticum (Wallr.) Fuck. 420

Galerina Earle 456
Ganoderma Karst 456
Ganoderma lucidum (Leyss. ex Fr.) Karst. 457, 458
Gasteromycetes 42
Gasteromycetidae 42
Gasteropileati 42
Geotrichum Link et Pers 72, 73
Geotrichum candidum (Link ex Persoon) Fr. 152
Geotrichum lactis (Fres.) Sacc. 153, 154
Gliocladium Corda 287
Gloeophyllum seliarium (Wulf. ex Fr.) Karst. 454
Gloesporium Auct. 419
Gloeosporium ribis (Lib.) Mont. et Desm. 427
Gonytrichum Nees et Wallroth 73
Graphium Corda 487
Guajacum 474

Harpellales 39
Helix pomatia 157, 353
Helminthosporium Link ex Fr. 72, 73, 287, 362, 469
Helminthosporium sativum Pammel, King et Bakke 361, 384
Hemiascomycetes 390
Heridium erinaceum (Fr.) Quel. 457
Holobasidiomycetidae 42
Hyalobotrys elegans Pidopl. 68
Hyalotheca Ehrenb. 26
Hydnaceae 50
Hydnum L. ex Fr. 451
Hyphales 60
Hyphochytriomycetes 25, 30, 441
Hyphomycetales 60, 444
Hyphomycetes 61

Juncus 445

Kickxellaceae 38
Kuehneromyces 453

Lactarius Gray 47, 452
Laetiporus sulphureus (Bull.) Bond. et Sing. 453, 454, 455
Lagenidiales 30, 31
Lagenidiaceae 31
Laminaria Lam. 445
Leccinum Gray 456
Lemna minor L. 324
Lentinellus Fr. 47
Lentinus edodes 457, 458
Lenzites Fr. 456
Lepiota procera (Scop. ex Fr.) Quel. 459
Lepista 453
— *nuda* (Fr.) W. G. Smith 450, 455
Leptomytaceae 34
Leptomytales 31, 33
Leptomytus lacteus 33
Lithophyllum 445
Lycoperdon pusillus Pers. 451, 456
— *puriforme* Scheaff. 455

Macrolepiota Sing. 43
— *procera* (Fr.) Sing. 450
Malbranchea pulchella Sacc. et Penzig. 275
Mangifera 446

- Marasmius* Fr. 452, 453
Mastigomycotina 59
Melaneomales 60
Melosira 26
Microsphaera alfitoides Gr. et Maubl. 40
Monacrosporium psychrophilum 68
Monilia Pers. 73
Moniliaceae 73
Monoblepharidales 29
Mucedinaceae 385
Mucor Mich. ex Fr. 287
Mucorales 36, 37, 38, 385, 390
Mucor circinelloides v. Tiegh. 122
— *hiemalis* Wehmer 121, 153
— *pusillus* Lindt. 121
— *racemosus* Fres. 122
Mycena Fr. 47, 451
— *polygramma* (Bull. ex Fr.) S. F. Gray 450
— *rosella* Pers, 451

Navicula 28
Nectria Fr. 419
Nematoloma Fr. 453
Nematoloma sublateralitium (Fr.) Karst. 456
Neurospora Shear et Dodge 102
— *crassa* Shear et Dodge 163, 467
Niptera sp. 41
Monodictis levis (Wilt.) Hughes 68

Oegonium Link 28
Olpidiaceae 25, 29
Olpidiopsidaceae 31
Olpidium gregarium Schr. 26
— *hyalothecae* 26
— *urticuliforme* 26
Oomycetes 25, 30, 441, 470
Oudemansiella Speg. 453
Oudemansiella radicata (Rehl.) Berk. 458

Paecilomyces Bain. 74
Paramaecium caudatum 297
Panus tigrinus 454, 456
Paxillus Fr. 451
Paxillus involutus Fr. ex Batsch. 452
Penicillium Link ex Fr. 65, 66, 69, 73, 74, 101, 107, 141, 204, 275, 289, 292, 295, 296, 304, 318, 432, 439, 466
— *canescens* Sopp 318
— *chrysogenum* Thom 134, 250, 318, 466
— *citreo-viride* Biourge 287
— *citrinum* Thom 206
— *claviforme* Bain 318
— *cyaneo-fulvum* Biourge 318
— *cyclopium* Westl. 318
— *funiculosum* Thom 280
— *gorlenkoanum* Baghd. 318, 319
— *godlewskii* Zaleski 318
— *islandicum* Sopp 287
— *lanoso-caeruleum* Thom 318
— *martensii* Biourge 318
— *meleagrinum* Biourge 318
— *paxilli* Bain. 318, 319
— *puberulum* Bain. 318
— *pusillum* Smith 318
— *raistrickii* Smith 318
— *restrictum* Gilman et Abbott 318, 319
— *rogueforti* Thom 318, 319
— *roseo-purpureum* Dierckx 318
— *rubrum* Stoll 287
— *sizovae* Baghd. 255, 318, 319
— *steckii* Zaleski 318
— *stoloniferum* Thom 280
— *urticae* Bain. 287
— *vitale* Pidopl. et Bilai 112, 113, 114, 125, 126, 467
Penus fragilis 458
Peronoplasmodium Berl. 36
Peronospora Corda 36, 419
Peronosporaceae 34, 35, 36
Peronosporales 31, 34, 35
Pestalotia truncata Lev. 68
Phaeolus schweinitzii (Fr.) Pat. 453
Phallus Hard. Jun. ex Pers. 453
Phialophora Medlar 63, 73
— *verrucosa* Medlar 63
Phleborus 456
— *sulphureus* 457
Pholiota (Fr.) Kummer 54, 450, 453, 456
Pholiota adiposa Fr. 454, 455, 458
— *aurivella* (Fr.) Quel. 454, 455
— *squarrosa* (Fr.) Quel. 450
Phlyctidiaceae 29
Phoma cucurbitacearum (Fr.) Sacc. 206
Phycomycetes 441
Physodermataceae 29
Phytophthoraceae 34, 35
Phytophthora infestans (Mont) de Bary 35, 426, 486, 487
— *parasitica* Dastur 487

- Piptocephalis* de Bary 38
Pithomyces chartarum (Berk. et Curt) Ellis 287, 294, 304
Plasmodiophora brassicae Wor. 427
Plasmopara Schroet. 35, 36
Plectomycetes 390
Pleospora herbarum (Pers.) Rabenh. 376
Pleurotus ostreatus (Fr.) Kummer 450, 453, 456, 458
— *rhodophyllus* 458
— *sapidus* Kalcher 457, 458
Pluteus stricapillus (Secr.) Sing. 450
Polyphagus parasiticus 27
Polyporus versicolor L. ex Fr. 458
Posidonia 445
Pseudomonas Migula 110
Pseudopycnidiales 60
Puccinia Pers. ex Pers. 102, 427
— *coronata* (Corda) Kleb. 421
— *graminis* Pers. 359, 419, 426, 427, 487
— *recondita* Rob. ex Desm. 359, 364
— *sorghii* Schw. 359
Pullularia pullulans (de Bary) Berkh. 350
Pulveroboletus 456
Pycnidiales 60
Pyrenophora teres (Died.) Drechsler 352
Pythium Pringsh 486
— *debaryanum* Hesse 35
Pythyaceae 34, 35, 36
- Radulum orbiculare* Fr. 50
— *pendulum* Fr. 50
Rhipidiaceae 34
Rhipidium americanum 34
Rhizidiaceae 26, 29
Rhizophora 446, 447
Rhizophydium cyclotellae Zopf. 26
— *fusus* 26
— *karlingii* 26
Rhizopus oligosporus Satio 111, 206, 287
— *oryzae* Went et Pr. Geerb. 121
Rhodosphaera oxyacanthae 40
Rhodotorula Harrison 102
Russula Pers. 451
— *decolorans* Fr. 455
Russulales 47
- Saccharomyces* (Meyel.) Rees 102
— *cerevisiae* Hans 110, 351
— *fragilis* 25-D Jorg 298
— *ludwigi* Hans 262
— *vini* Kayser 298, 299
Saprolegniaceae 32, 33
Saprolegniales 30, 31, 32
Sargassum Ag. 445
Schizophyllum commune Fr. 451, 453, 456
Sclerospora Schroet. 35, 36
Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary 427
Scopulariopsis Bain. 72, 287
Serpula lacrymans (Wulf. ex Fr.) Bon. 458
Siroplidiaceae 32
Sordaria Ces. et de Not. 436
Sparassis crispa (Wulf.) Fr. 455
Spartina 445
Sphaeropsidales 60, 61, 444
Sphaeropsis Lev. 419, 420
Sphaerotheca mors-uvae Berk. et Curt. 427
Sporophlyctis rostrata Serb. 27
Stachybotrys Corda 63, 466
— *alternans* Bonn. 143, 287, 289, 290, 291, 294, 295, 296, 304, 466
— *atra* Cda. 287
— *lobulata* Berk 287
Staphylococcus aureus Bergey 209, 298
Stemphylium Wallr. 384
Stromatinia Boudier 419
Suillus luteus (Fr.) S. F. Gray 452
— *piperatus* 452
Syncephalastrum Schroet. 38
Syncephalis v. Tiegh. et Le Monnier 38
Synchytriaceae 25, 29, 419
Synedra Ehr. 32
- Tapesia fusca* (Pers.) Rehm 41
Taphrina Fr. 420
Teliosporae 42
Tetracladium setigenum (Grove) In-gold 68
Tetrahymena piriformis 297
Thalassia 445
Thalassiomycetes 441
Thamnidium Link. 37
Thielavia Zopf 436
Thielaviopsis Went 63, 73

- Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.)
 Ferr. 73
Thraustochytriaceae 30, 32
Tilletia Tul. 419
Torula sanguinea Schimmon 452
Torulomyces lagena 63
Tradescantia virginica 82
Tremella fuciformis Berk. 458
Tribonema Derb. et Sol. 27
Trichoeladium asperum Harz 73
 — *opacum* (Corda) Harz 68
Trichoderma Pers. 63, 141, 295,
 296, 469
Trichoderma koningii Oud. 182
 — *viride* Pers. ex Fr. 182
Tricholoma equestre (Fr. ex Linn)
 Quel. 451, 452
 — *georgii* Fr. 450
 — *vaccinium* (Pers. ex Fr.) Kumm.
 450
Tricholomopsis platyphylla 450
Tricholomotales 49
Tricholomycetes 25, 39
Trichophyton Malmsten 275
Trichos haeria sp. 41
Trichothecium roseum Link 68
Truncatella truncata (Lev.) Steyaert
 (cm. *Pestalotia*
 — *truncata* Lev.)
- Tubercularia* Tode 63
Tulasnella Schroet. 55
- Ulothrix* 26
Uredinales 43
Ustilaginales 43
Ustilago (Pers.) Roussel 427
 — *hordei* (Pers.) Lagerh. 352
 — *maydis* (DC.) Cda. 352
 — *tritici* (Pers.) Jensen 419
 — *zeae* (Schw.) Unger 329
Venturia inaequalis (Cke.) Aderh.
 354, 420
Verticillium albo-atrum R. et Berth.
 487
 — *dahliae* Klebahn 487
 — *lateritium* Berk. 63
 — *tricorpus* Jsaak 487
Volvariella bombycina (Fr. ex Pers.)
 Sing. 458
- Xerocomus* Er. 456
- Zostera* L. 445
Zygomycetes 25
Zygomycotina 59

**ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА ДУДКА,
СОЛОМОН ПАВЛОВИЧ ВАССЕР,
ИРИНА АЛЕКСЕЕВНА ЭЛЛАНСКАЯ и др.**

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МИКОЛОГИИ

Справочник

*Печатается по постановлению ученого совета Института
микробиологии и вирусологии АН УССР
и решению редакционной коллегии справочной литературы АН УССР*

Редактор *А. В. Янковская*
Оформление художника *В. Г. Самсонова*
Художественный редактор *А. В. Косяк*
Технический редактор *И. Н. Лукашенко*
Корректоры *Е. Н. Межеричкая, Д. Я. Кашпер,
С. Е. Ноткина, Л. М. Тищенко*

Информ. бланк № 3907.

Сдано в набор 01. 04. 81. Подп. в печ. 01. 02. 82. БФ 01618. Формат 84×108¹/₃₂.
Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 28,98. Усл. кр.-отт. 28,98.
Уч.-изд. л. 41,17. Тираж 5500 экз. Заказ 2-66. Цена 2 руб. 40 коп.

Издательство «Наукова думка», 252601 Киев, ГСП, Репина, 3.

Отпечатано с матриц Головного предприятия на Харьковской книжной
фабрике «Коммунист», 310012, Харьков-12, Энгельса, 11.